

Université de Montréal

Propriétés de surface des nanoparticules et interactions avec les cellules endothéliales vasculaires

par
Soudeh Fakhari Tehrani

Université de Montréal

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté de pharmacie
en vue de l'obtention du grade de de PhD en Sciences Pharmaceutiques
Option technologie pharmaceutique

Juin 2019

© Soudeh Fakhari Tehrani, 2019

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Propriétés de surface des nanoparticules et interactions avec les cellules endothéliales vasculaires

Présentée par
Soudeh Fakhari Tehrani

Université de Montréal, Faculté de pharmacie

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président-Rapporteur : Pr Xavier Banquy
Examineur externe : Pr Nicolas Bertrand
Membre du jury : Pr Davide Brambilla
Directeur de recherche : Pr Patrice Hildgen
Co-directeur de recherche : Pre V.G Roullin
Représentant du doyen de la FESP : Pre Annie Angers

Résumé

Les traitements et l'imagerie des tumeurs cérébrales malignes se sont avérés jusqu'à présent très peu efficaces, en raison de la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui freine le passage des molécules thérapeutiques mais aussi diagnostiques vers les tissus du système nerveux central (SNC). Le développement de vecteurs nanométriques chargés en agents thérapeutiques et capables de traverser la BHE pourrait être une alternative pour améliorer la bio-distribution de principes actifs et d'agent d'imagerie au cerveau. Parmi les différents types de vecteurs proposés, les nanoparticules polymériques (NP) constituées de polymères dibloc comportant un bloc de poly (éthylène glycol) (PEG) pourrait présenter une solution prometteuse pour transporter des actifs à travers la BHE. La PEGylation de la surface des NPs améliore la stabilité colloïdale des NPs. De plus, elle diminue l'adsorption non spécifique des protéines à la surface de NPs (appelée aussi opsonisation). La vitesse de clairance des NPs est ainsi ralentie et les NPs circulent plus longtemps dans le sang. Malgré l'effet bénéfique de la couche de PEG à la surface des NPs, le rôle exact des propriétés de surface liées à la longueur de la chaîne PEG sur l'interaction des NPs avec les cellules endothéliales vasculaires est mal compris.

Dans une première partie de ce travail, le rôle de la longueur de PEG sur l'endocytose et la transcytose des NPs a été étudié sur des monocouches de cellules bEnd.3, un modèle *in vitro* de BHE. Les mécanismes de transport des NPs ont été évalués en utilisant différents inhibiteurs de l'endocytose. La quantification du taux d'endocytose et de transcytose a révélé que l'endocytose et la transcytose des NPs augmentaient avec la longueur de la chaîne de PEG. Les taux d'endocytose et de transcytose les plus élevés ont été observés pour les NPs de PLA-PEG₅₀₀₀ et de PLA-PEG₁₀₀₀₀. Les résultats de l'étude mécanistique démontrent que la longueur de la chaîne de PEG influence la voie d'endocytose empruntée par les NPs PEGylées à travers un modèle *in vitro* de BHE.

Dans une seconde partie de ce travail, l'effet de la longueur du PEG sur la toxicité des NPs et les processus inflammatoires a été étudié sur deux modèles de monocouche de cellules endothéliales vasculaires, soit les cellules bEnd.3 et HUVEC. L'effet de la longueur des chaînes de PEG sur l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire aux NPs PEGylées a été évalué par qPCR. De plus, le potentiel de génération de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO

ou ROS) par les NPs a été évalué en utilisant le test cellulaire basé sur l'oxydation de la DCFH-DA. Les résultats démontrent que les NPs PEGylées induisent une augmentation légère et transitoire de l'expression des gènes des cytokines et des chimiokines inflammatoires. Cependant, la longueur des chaînes de PEG ne présente pas un effet significatif sur l'expression des gènes des cytokines et des chimiokines. De plus, nos résultats ne montrent pas l'induction de la génération de ROS par les NPs PEGylées.

En résumé, la longueur de chaîne de PEG influence le taux d'endocytose et de transcytose. La voie d'endocytose impliquée dans l'internalisation et la transcytose est influencée par la longueur des chaînes de PEG. En revanche, les différences de longueur des chaînes de PEG ne modulent pas significativement l'expression des cytokines et de chimiokines inflammatoires.

Ces résultats devraient contribuer à développer des nanoformulations qui traversent plus efficacement la BHE, tout en minimisant les effets toxiques, notamment inflammatoires sur les cellules endothéliales vasculaires de la BHE. Ces perspectives devront toutefois être confirmées sur des modèles *in vivo*.

Mots-clés : Nanoparticules, dibloc PLA-*b*-PEG, Endocytose, Transcytose, Dérivés réactifs de l'oxygène, Cytokines, Chimiokines

Abstract

To date, imaging and treatment of brain tumors are proved to be very inefficient due to the presence of the blood-brain barrier (BBB). The (BBB) is a semipermeable barrier which prevents or restrains most therapeutic and diagnostic molecules reach the central nervous system (CNS). Polymeric nanoparticles (NPs) loaded by therapeutics molecules and diagnostic agents could represent a promising solution to help active ingredients to cross the BBB and as a consequence, their biodistribution to the brain could be improved.

Polymeric NPs composed of di-block copolymers, such as poly (ethylene glycol) blocks (PEG) that bind to polyester hydrophobic chains, are considered one of the most versatile nanocarriers for transporting therapeutic molecules across the BBB.

PEG on the surface of NPs improves the NPs colloidal stability. Furthermore, PEG surface coating decreases the non-specific adsorption of proteins on the surface of NPs (also called opsonization); therefore, the clearance rate of the NPs is slowed down and NPs circulation times in blood is extended. Despite the beneficial effect of the PEG coating on the surface of NPs, the exact role of the surface properties related to the PEG chain length on NPs interactions with the vascular endothelial cells is poorly understood.

In first article, the role of PEG chain length on brain vascular endothelial cells endocytosis and transcytosis is investigated on monolayers of bEnd.3 cells as an *in vitro* BBB model. The NPs transport mechanisms were then investigated by using different endocytosis inhibitory processes. Our results revealed that NPs endocytosis and transcytosis rates increased with PEG chain length. Higher endocytosis and transcytosis rates were observed for PLA-PEG₅₀₀₀ and PLA-PEG₁₀₀₀₀ NPs. Moreover, the mechanistic studies demonstrated that the PEG chain length influenced the endocytosis pathway taken by PEGylated NPs through an *in vitro* model of BBB.

In second article, the effect of PEG length on NPs cytotoxicity and inflammatory processes has been investigated in two vascular endothelial cell lines (bEnd.3 and HUVEC). The effect of PEG chain length coating on gene expression that are involved in the inflammation response was investigated by qPCR. Moreover, the potential Reactive Oxygen Species (ROS) generation was evaluated with DCFH-DA probe. The results showed that PEGylated NPs induce

a mild and transient activation of inflammatory cytokine and chemokine genes. However, the length of the PEG chains did not modulate significantly gene expression of inflammatory cytokines and chemokines. Furthermore, our results showed that PEGylated NPs did not induce ROS generation.

In summary, the chain length of PEG influences the endocytosis and transcytosis rate. The pathway of endocytosis involved in internalization and transcytosis is influenced by the length of PEG chains. In contrast, differences in the length of PEG chains did not significantly modulate the expression of cytokines and inflammatory chemokines.

These results contribute to develop nanoformulations that cross the BBB more efficiently while keeping the toxic and inflammatory effects minimal, particularly on the vascular endothelial cells of the BBB. Nevertheless, these perspectives have to be confirmed on in vivo models.

Keywords : Nanoparticles, diblock PLA-*b*-PEG, Endocytosis, Transcytosis, Reactive Oxygen Species, Cytokines, Chemokines

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIV
REMERCIEMENTS	XVII
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 LES NANOTECHNOLOGIES PHARMACEUTIQUES & ADMINISTRATION AU CERVEAU.....	2
1.1.1 Les voies possibles à travers la BHE :.....	3
1.1.2 Les voies qui contournent la BHE	4
1.1.3 Les nanoparticules pour traverser la BHE.....	9
1.2 LES PRINCIPAUX TYPES DE NANOVECTEURS	10
1.2.1 Nanogels	10
1.2.2 Dendrimères.....	10
1.2.3 Liposomes	10
1.2.4 Nanoparticule lipidique solide.....	11
1.2.5 Micelles	12
1.2.6 Nanoparticules polymères	12
1.3 LES POLYMÈRES SYNTHÉTIQUES BIODÉGRADABLES.....	14
1.3.1 Les polyesters.....	14
1.3.2 Les polymères diblocs	15
1.3.3 Les différentes approches de synthèse des polymères diblocs.....	16
1.3.3.1 Réaction de couplage	17
1.3.3.2 Réactions de polymérisation par ouverture du cycle	17
1.4 MÉTHODES DE PRÉPARATION DES NANOPARTICULES	18
1.4.1 Méthodes de préparation des NPs en deux étapes.....	18

1.4.2	<i>Méthodes de préparation des NPs à une étape</i>	19
1.4.3	<i>Paramètres de nanopréciipitation à contrôler</i>	20
1.4.3.1	Concentration de polymère dans la phase organique.....	20
1.4.3.2	Vitesse du mélange des phases organiques et aqueuses	20
1.4.3.3	Masse moléculaire des polymères	21
1.4.3.4	Rapport de poids entre le bloc hydrophile et hydrophobe	21
1.5	CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES	21
1.5.1	<i>La taille</i>	21
1.5.2	<i>Charge de surface</i>	24
1.5.3	<i>Composition chimique de surface</i>	26
1.5.4	<i>Stabilité des systèmes nanoparticulaires</i>	28
1.5.5	<i>Structure du cœur et morphologie des NPs</i>	29
1.6	INTERACTIONS AVEC LE VIVANT : « L'INTERFACE NANO BIO »	34
1.6.1	<i>Couronne protéique : établissement et conséquences biologiques</i>	34
1.6.1.1	Les protéines de système du complément.....	35
1.6.1.2	Les immunoglobulines.....	36
1.6.1.3	Les apolipoprotéines	36
1.6.1.4	Autres protéines	36
1.6.2	<i>Paramètres physicochimiques des NPs et couronne protéique</i>	37
1.6.3	<i>Élimination des NPs par macrophages</i>	38
1.6.4	<i>Inflammation, réponse à un corps étranger (« foreign body reaction»)</i>	38
1.6.4.1	Les mécanismes généraux de réponse à un corps étranger	38
1.6.4.2	Rôle de la couronne protéique dans l'inflammation	39
1.7	INTERACTION AVEC LE VIVANT : ENDOCYTOSE DES NPs	41
1.7.1	<i>Endocytose : les mécanismes généraux</i>	42
1.7.2	<i>Endocytose : rôle des paramètres physicochimiques des NPs</i>	43
1.7.2.1	Taille des NPs	43
1.7.2.2	Charge	44
1.7.2.3	Chimie de surface	45
	Autres paramètres	46
1.8	INTERACTION AVEC LE VIVANT : LA TRANSCYTOSE	47

1.8.1	<i>Taille des NPs</i>	47
1.8.2	<i>Charge de surface</i>	48
1.8.3	<i>Chimie de surface</i>	48
1.8.4	<i>Autres paramètres</i>	49
2	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	50
2.1	JUSTIFICATION DE L’HYPOTHÈSE	51
2.2	HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	53
2.3	OBJECTIFS DE RECHERCHE ET MÉTHODOLOGIES	53
2.3.1	<i>Objectif 1 : Synthèse et caractérisation des nanomatériaux : les polymères et les nanoparticules</i>	53
2.3.2	<i>Objectif 2 : Évaluation de l’endocytose et de la transcytose</i>	54
2.3.3	<i>Objectif 3 : Effet pro-inflammatoire des NPs sur les cellules endothéliales vasculaires</i>	54
	BIBLIOGRAPHIE	56
3	ARTICLE 1 “LENGTH OF SURFACE PEG MODULATES NANOCARRIER TRANSCYTOSIS ACROSS BRAIN VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS”	73
3.1	ABSTRACT	75
3.2	BACKGROUND	76
3.3	METHODS	77
3.3.1	<i>Polymer syntheses and characterizations</i>	77
3.3.2	<i>Nanoparticle preparation, purification and physicochemical characterizations</i>	78
3.3.3	<i>In vitro biological assays</i>	79
3.3.4	<i>Statistical analyses</i>	81
3.4	RESULTS	82
3.4.1	<i>Polymer syntheses</i>	82
3.4.2	<i>Colloidal stability of NPs</i>	84
3.4.3	<i>Endocytosis in brain endothelial cells</i>	86
3.4.4	<i>Transcytosis assays</i>	88
3.5	DISCUSSION	90

3.6	REFERENCES	94
ANNEXE 1 : INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES ARTICLE 1.....		98
CHEMICAL PROCEDURES.....		99
	<i>Chemical materials and reagents</i>	99
	<i>Diblock PLA-PEGX polymers (X: 1, 2, 5,10 kDa)</i>	99
	<i>Polymer purification</i>	103
SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PLA –PEG NPs.....		104
	<i>Diffusion-ordered spectroscopy experiments (DOSY)</i>	107
	<i>NP concentration determination</i>	110
	<i>Determination of PEG presence and surface density by ¹H NMR</i>	110
	<i>Study of colloidal stability of nanoparticles</i>	111
	Study of NP colloidal by Static Multiple Light Scattering	111
	Study of NP colloidal stability by Dynamic Light Scattering	114
IN VITRO BIOLOGICAL ASSAYS.....		114
	<i>Biological materials and reagents</i>	114
	<i>Cell viability assays</i>	116
	<i>ZP measured in culture media</i>	117
	<i>Endocytosis assays</i>	118
	<i>Flow cytometry (FACS) analysis</i>	119
	<i>Fluorescence microscopy</i>	121
	<i>Transcytosis assays</i>	123
STATISTICAL ANALYSIS.....		126
REFERENCES ANNEXE 1		129
4	ARTICLE 2 “PEG LENGTH OF PLA-PEG NANOPARTICLES MODULATES NANOPARTICLE INTERACTIONS WITH ENDOTHELIAL CELLS: EFFECTS ON INFLAMMATORY RESPONSES AND ROS PRODUCTION”.....	130
4.1	ABSTRACT	132
4.2	INTRODUCTION.....	132
4.3	MATERIAL AND METHODS	134

4.3.1	<i>Chemical Materials & Reagents</i>	134
4.3.2	<i>Synthesis and characterization of polyethylene glycol-poly (lactic acid) diblock copolymer</i>	134
4.3.3	<i>Nanoparticle preparation and characterization</i>	134
4.3.4	<i>Cell culture</i>	135
4.3.5	<i>Cytotoxicity Assay</i>	135
4.3.6	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>	135
4.3.7	<i>Intracellular reactive oxygen species (ROS) measurement</i>	136
4.3.8	<i>Statistical analysis</i>	137
4.4	RESULTS.....	137
4.4.1	<i>Nanoparticle preparation and characterization</i>	137
4.4.2	<i>Cytotoxicity Assay</i>	138
4.4.3	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>	139
4.4.4	<i>Intracellular reactive oxygen species measurement</i>	145
4.5	DISCUSSION.....	147
4.5.1	<i>Interleukin expression</i>	148
4.5.2	<i>Tumor necrosis factor and colony stimulating factor expression</i>	148
4.5.3	<i>Inflammatory chemokines</i>	149
4.5.4	<i>Adhesion molecule</i>	150
4.5.5	<i>Transcription factor: NF-κB</i>	150
4.5.6	<i>Covalent vs physisorbed PEG-coated NPs</i>	151
4.5.7	<i>ROS generation by NP exposure</i>	151
4.5.8	<i>Inflammation induction mechanism by polymeric NPs</i>	152
4.6	CONCLUSION.....	152
4.7	REFERENCES	154
ANNEXE 2: INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES ARTICLE 2.....		159
CHEMICAL MATERIALS & REAGENTS		160
SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLYETHYLENE GLYCOL-POLY (LACTIC ACID)		
DIBLOCK COPOLYMER		160
NANOPARTICLE PREPARATION AND CHARACTERIZATION		162

STATISTICAL ANALYSIS.....	164
CYTOTOXICITY ASSAYS.....	165
QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION OF INFLAMMATORY CYTOKINES AND CHEMOKINES	167
COMPARISON OF GENE EXPRESSION PATTERN BETWEEN BEND.3 CELLS AND HUVEC.....	173
REFERENCES ANNEXE 2	180
5 DISCUSSION ET CONCLUSION.....	181
5.1 MISE EN CONTEXTE.....	182
5.2 LA SYNTHÈSE DE POLYMÈRE.....	182
5.3 FABRICATION ET PURIFICATION DES NPS	183
5.4 CARACTÉRISATION DE LA COUCHE DE PEG EN SURFACE.....	184
5.5 STABILITÉ DES NANOSUSPENSIONS ET EFFETS BIOLOGIQUES	185
5.6 INTERACTIONS AVEC LE VIVANT : « L’INTERFACE NANOBIO »	186
5.6.1 <i>Modèle de transcytose de BHE in vitro</i>	186
5.6.2 <i>Endocytose et transcytose de BHE in vitro</i>	188
5.6.2.1 Rôle de la présence de sérum dans les milieux.....	188
5.6.2.2 Les voies d’endocytose	188
5.6.2.3 La transcytose	189
5.6.3 <i>L’inflammation</i>	190
5.6.4 <i>Endocytose et induction de la réponse inflammatoire</i>	191
5.6.5 <i>Dégradation des NPs et induction de l’inflammation</i>	192
5.7 PERSPECTIVES : FUTURES ÉTUDES POUR LA SUITE DU PROJET	192
5.7.1 <i>Endocytose et transcytose au niveau de la BHE</i>	192
5.7.2 <i>NPs et inflammation au niveau de la BHE</i>	193
5.8 CONCLUSION GÉNÉRALE.....	195
ANNEXE 3: CURRICULUM VITAE SCIENTIFIQUE	201

Liste des tableaux

Chapitre 1 :

Tableau 1.1 : Différentes techniques proposées pour permettre le passage de molécules thérapeutiques à travers la BHE.....	7
Tableau 1.2 : Principales techniques de caractérisation des nanoparticules	31
Tableau 3.1: PLA-PEG nanoparticle characteristics after complete purification.	84
Tableau 4.1 : PLA-PEG NPs characteristics after complete purification (n = 3 (3 independent batches, 3 measurements per batch), mean \pm SD).	138

ANNEXE 2 :

Table S 1 : Chemical ratios as well as characteristics obtained for PLA-PEG _x (X: 1, 2, 5 or 10 kDa).....	162
Table S 2 : List of mouse cytokines and chemokines studied by qPCR in bEnd.3 cells.	168
Table S 3 : List of human cytokines and chemokines studied by qPCR in HUVEC.....	169
Table S 4: Main functions of inflammatory cytokines and chemokines expressed in bEnd.3 cells and and HUVEC.....	170

Liste des figures

Chapitre 1 :

Figure 1.1 : Représentation schématique de la barrière hématoencéphalique. En rouge les cellules endothéliales, en mauve les péricytes, en bleu les extensions des astrocytes. En pointillés : la membrane basale. Figure tirée et adaptée de la référence (5).	2
Figure 1.3 La structure chimique des polyesters: polylactide (PLA), poly (lactide-co-glycolide) (PLGA), poly(ϵ -caprolactone) (PCL).	14
Figure 1.4 Réaction de couplage pour former un dibloc de type PLGA- <i>b</i> -PEG.	17
Figure 1.5 La polymérisation par POC initié par mPEG-OH en présence de catalyseur pour former un dibloc PLA-PEG _x	17
Figure 1.6 Double couche diffuse de solvation d'une particule chargée négativement	26
Figure 1.7 Étapes principales d'une réaction inflammatoire déclenchée par un implant polymère	39
Figure 1.8 : Les principales voies d'endocytose. Figure tirée de la référence (226)	43
Figure 3.1: Ring-opening polymerization (ROP) a) synthesis of diblock PLA-PEG _x polymers; b) synthesis of PLA-Pyrene (FLU-PLA) polymers; c) synthesis of benzyl ester-capped (PLA-BZ) polymer.	83
Figure 3.2: NP colloidal stability in various media as evidenced by the global TSI value a) PLA, d) PLA-PEG ₁₀₀₀ and g) PLA-PEG ₅₀₀₀ NPs.	85
Figure 3.3: a) Endocytosis rates (E%) as measured by the direct method after a 3-h incubation, as a function of PEG length. Results are the means \pm SD of 4 separate incubations. Relative endocytosis rates b) for PLA-PEG ₂₀₀₀ , c) PLA-PEG ₅₀₀₀ and d) PLA-PEG ₁₀₀₀₀ NPs in presence of various cellular uptake inhibitors.	87
Figure 3.4: Translocation efficiency (T%) as a function of PEG length for a) a 3-h incubation and b) a 24-h incubation. c) Apparent permeability at 3 h (plain line), and 24 h (dashed line). d) Relative transcytosis rates (rel. T%) after a 24-h incubation, in presence of various cellular uptake inhibitors: without any inhibitor (black dashed line, reference 100%), GEN (dotted red line), PS2 (blue plain line) and EIPA (green plain line). Results are the mean \pm SD of 6 separate incubations.	89
Figure 4.1 : Cell viability of a) bEnd.3 cells and b) HUVEC after a 24-h exposure to PLA-w/o-F68, PLA-w-F68 and PLA-PEG _x at 1,000 μ g/mL. The box and whiskers display the median, lower and upper quartiles and 95% confidence interval around the median; n= 4, 4 independent assays and quadruplicate wells per sample per assay).	139
Figure 4.2: Relative mRNA expression inflammatory cytokines and chemokines in treated bEnd.3 cells versus untreated cells. Cells treated with PLA-w-F68, PLA-PEG _x NPs for 6-h (grey bars) and 24-h (white bars). a: IL-6, b: CXCL1, c: CXCL10 d: CXCL11 e: CCL2 f: ICAM1 g: M-CSF	142
Figure 4.3: Relative mRNA expression of inflammatory cytokines and chemokines in treated HUVEC versus untreated cells. Cells treated with PLA-w-F68, PLA-PEG _x NPs for 6-h (grey bars) and 24-h (white bars). a: IL-6, b: IL-1 α , c: IL-1 β , d: CXCL1, e: CXCL10, f: CXCL11, g: CCL2, h: NF κ B1.	144

Figure 4.4: Oxidative stress response after treating bEnd.3 cells and HUVEC with PLA-w/o-F68, PLA-w-F68 and PLA-PEGx NPs for either 2-h (a1, b1) or 6-h (a2, b2). Untreated cells were used as negative controls and LPS and H₂O₂ were used as positive controls. 146

Liste des abréviations

BHE	Barrière hématoencéphalique
NP	Nanoparticule
PEG	Poly(éthylène glycol)
PLA	Poly(lactique)
PLGA	Poly(lactique-co-glycolique)
PLA-PEG	Poly(éthylène glycol)-Poly(lactique), polymère dibloc
PLA-BZ	PLA benzyl ester-capped
ROP	Polymérisation par ouverture de cycle (Ring Opening Polymerization)
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCM	Dichlorométhane
THF	Tétrahydrofurane
RMN	Résonance magnétique nucléaire (NMR)
GPC	Chromatographie à perméation de gel (Gel Permeation Chromatography)
TFF	Filtration tangentielle (Cross-flow filtration)
DLS	Dynamic Light Scattering (dispersion dynamique de la lumière)
ELS	Electrophoretic Light Scattering
DOSY	Diffusion-ordered spectroscopy
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
MEB	Microscopie électronique à balayage (SEM)
MET	Microscopie Électronique à Transmission (TEM)
cryo-MET	Microscopie Électronique à Transmission à basse température
AFM	Microscopie de force atomique (Atomic Force Microscopy)

XPS	Spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X
EIPA	(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride
GEN	Genistein
CPZ	Chlorpromazine
PS2	Pitstop®2
P _{app}	Perméabilité apparente (Apparent permeability)
MTT	Sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)
ROS	Dérivés réactif de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)

که مردی غم مخور از دوری و دوری
 دانی که رسیدن بهر کام زمان است
 آبی که بر آسود زمینش بخورد زود
 دریا شود آن رود که پیوسته روان است
 باشد که یکی هم به نشانی نشیند
 بس تیر که در چلای این کس نهان است
 از راه مروی که آن کوهر مقصود
 کنی ست که اندر قدم راه روان است
 امیر یونگ ابتهج

Si tu es persuadé de la réalité de ton
 chemin
 Ne t'inquiète pas de l'éloignement de
 ton but
 Atteindre sa destination n'est qu'une
 question de temps
 L'eau stagnante est absorbée par le sol
 Les petits ruisseaux qui continuent leur
 chemin formeront la mer
 La vie est comme un arc tendu
 Qui lance plus de flèches augmente ses
 chances de toucher la cible
 Il ne faut pas cesser de persévérer
 Réussir c'est comme un trésor offert à
 celui qui persévère
 Amir Hushang Ebtehaj
 A.H Sayehi (« Ombre »), poète persan
 (1928-)

Remerciements

Mes remerciements vont en premier lieu à mon directeur de recherche, le Pr Patrice Hildgen qui m'a soutenue au moment où j'en avais le plus besoin. Je le remercie également pour la confiance qu'il m'a accordée.

Je tiens à remercier ma co-directrice, la professeure V. Gaëlle Roullin pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie également notre collaborateur français le Pr. Guillaume Bastiat. Sans son aide et son efficacité au travail, la réalisation de mon deuxième article n'aurait pas été possible.

Je remercie également la professeure Sylvie Marleau. Elle m'a beaucoup aidé en me dirigeant durant la rédaction de mon deuxième article sur un sujet qui était très nouveau pour moi. Merci Sylvie pour tout le temps que vous m'avez consacré et toute l'aide que vous m'avez apportée. J'ai beaucoup appris scientifiquement et humainement.

Merci aux différents membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ce travail, soient les Prs X. Banquy (président); N. Bertrand & D. Brambilla (examineurs).

Je tiens à remercier, la vice-rectrice adjointe aux études supérieures et administratrice exerçant les fonctions de doyenne de la Faculté des études supérieures et postdoctorales, la Pre Michèle Brochu pour le support et soutien qu'elle m'a apporté. Sans son soutien il n'aurait pas été possible de finaliser cette thèse de doctorat. Je tiens également à remercier le Pr Daniel Lévesque vice-doyen aux études supérieures et à la recherche et la Pre Lyne Lalonde, Doyenne de la faculté de pharmacie, leur aide m'a permis de finaliser ma thèse dans les meilleures conditions possibles.

Je dois remercier le Pr Xavier Banquy qui m'a donné la chance de collaborer avec son laboratoire sur plusieurs projets, ce qui m'a permis d'élargir mes connaissances dans les domaines des nanoparticules et polymères. Je suis également reconnaissante d'avoir pu grâce de ces collaborations améliorer mon dossier de publication.

Je remercie le Dr Jean-Michel Rabanel pour ses conseils scientifiques et techniques tout au long de mon doctorat. Je suis très reconnaissante de son aide pour la correction du français de ce mémoire.

Je remercie Cloé Esposito, Sara Soufsaf : à trois on forme la meilleure équipe du monde. On est les trois mousquetaires avec Victor Passos. Je suis persuadée qu'on va organiser un «Young Scientists Conference» extraordinaire lors de la conférence annuelle de la FIP (Federation international pharmaceutical) en 2020. Je suis très contente de vous avoir rencontré et de vous avoir dans mon cercle d'amis.

Je remercie Pr Denis Deblois qui m'a donné la chance de participer au comité d'organisation de FIP ou j'ai beaucoup appris.

Je remercie également le Dr. Guillaume Bonnefois. Sans ta présence la vie à la faculté et même à Montréal était beaucoup moins agréable. Je remercie également le Dr. Steven Sanche non seulement pour son regard critique pour m'aider à choisir les bons tests statistiques et aussi pour tous les moments agréables qu'on a passé ensemble.

Je remercie également les étudiants de 3^{ème} et 4^{ème} étage présents et passés: Anaëlle, Florian, Ina, Jimmy, Augustine, Pierre-Luc, Imade, Deniz, Fatéma, Abdollah, Alexandre et Florence. Sans vous, votre énergie et aide, la vie de la faculté n'était pas pareille !.

Je remercie également les chimistes de l'IRIC pour leurs conseils scientifiques.

Merci à mes parents et mon frère qui ont toujours été présents malgré la distance géographique, et qui m'ont encouragé avec beaucoup de bienveillance. À toi aussi, mon Agha Shireh pour tous les soutiens et support que tu m'as apporté. Sans ton support moral je ne suis pas sûre que j'aurais eu le courage et l'énergie de finaliser ce travail.

Je remercie Omid et Chloé pour tous les moments intenses que nous avons vécus ensemble. Tous ces moments agréables m'ont permis d'oublier les moments difficiles durant ma thèse. Je remercie notre petit Shiva aussi.

Différents organismes m'ont soutenu financièrement. Je remercie la « Bourses de recherche Mitacs Globalink», le « Programme de bourses pour de courts séjours d'études universitaires à l'extérieur du Québec par Ministère de l'Éducation et de l'Enseignement supérieur ». Je remercie également la Faculté de pharmacie pour la bourse de mobilité. La Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal m'a offert une bourse de la rédaction qui m'a permis de finaliser ma thèse.

1 Introduction

1.1 Les nanotechnologies pharmaceutiques & administration au cerveau

Parmi toutes les pathologies humaines, les maladies du système nerveux central (SNC) constituent un des défis les plus importants pour des traitements pharmacologiques conventionnels. La raison principale de ces échecs est la présence de la barrière hématoencéphalique (BHE). La BHE est une structure anatomique dont les capillaires sanguins sont particulièrement imperméables, ce qui freine grandement le passage des molécules diagnostiques et thérapeutiques vers les tissus du SNC (1, 2). La BHE permet seulement un accès sélectif des nutriments nécessaires et des molécules de signalisation cellulaire nécessaires au cerveau. Elle est composée de différents types cellulaires, soient les cellules endothéliales vasculaires, les péricytes et les astrocytes (3). Les cellules endothéliales de la BHE ont la particularité de posséder des jonctions serrées, un ensemble de protéines reliant les cellules entre elles et limitant le passage paracellulaire (Figure 1.1) (4). Ces jonctions serrées ne permettent un passage paracellulaire à travers la BHE qu'aux molécules les plus petites ($<2\text{nm}$).

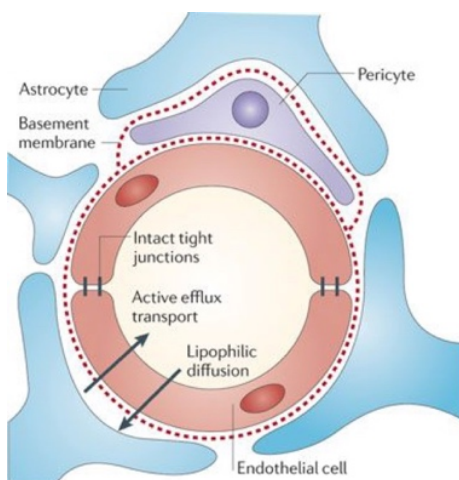


Figure 1.1 : Représentation schématique de la barrière hématoencéphalique. En rouge les cellules endothéliales, en mauve les péricytes, en bleu les extensions des astrocytes. En pointillés : la membrane basale. Figure tirée et adaptée de la référence (5).

Certaines petites molécules hydrophobes peuvent traverser la BHE par diffusion passive. Plus précisément, les molécules hydrophobes avec un poids moléculaire inférieur à 400 Da qui forment moins de 8 liaisons hydrogène peuvent traverser la BHE par diffusion passive (6). Les molécules chargées sont bloquées dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique et en conséquence, ils ne peuvent pas traverser la BHE (7).

1.1.1 Les voies possibles à travers la BHE :

- *Perméabilité par canaux* : Dans la membrane des cellules endothéliales cérébrales existent des protéines-canaux spécialisées pour le transport des petits ions tel que Na^+ , Cl^- , K^+ (8) ou de l'eau (9).
- *Diffusion facilitée* : Des molécules vitales telles que le glucose ou certains acides aminés polaires peuvent traverser la BHE par l'intermédiaire d'un transporteur membranaire. Dans le cas de la diffusion facilitée, la traversée des cellules est effectuée uniquement dans le sens du gradient de concentration et donc elle ne nécessite aucune énergie. Le transport du glucose à travers la BHE est assuré par les transporteurs de glucose GLUT-1 et GLUT3 (10). Les GLUTs pourraient être considérés comme une voie d'entrée pour l'administration des médicaments au système nerveux central (SNC).
- *Transport actif* : Contrairement à la diffusion facilitée qui permet que certaines molécules traversent la BHE sans consommation d'énergie, dans le cas du transport actif, le transport est effectué à l'encontre du gradient de concentration. Le transport actif nécessite de l'énergie. Cette énergie est fournie par la réaction qui transforme l'Adénosine Triphosphate (ATP) en Adénosine Diphosphate (ADP) ou monophosphate (AMP). Le transport actif est utilisé par les pompes d'influx (du sang vers le cerveau) et d'efflux (du cerveau vers le sang). Une grande variété de systèmes de transporteurs d'influx et d'efflux a été identifiée au niveau de la BHE telle que les transporteurs d'anions et de cations organiques, les transporteurs de peptides, les transporteurs de nucléosides, etc.(11).

- **Transcytose:** La transcytose correspond à un passage intracellulaire par le trafic vésiculaire. Elle comprend une étape d'endocytose, qui consiste en un ensemble de mécanismes d'entrée de différents cargos (notamment les macromolécules ou les nanoparticules naturelles) dans la cellule par l'intermédiaire de la formation d'une vésicule au niveau de la membrane plasmique, avec ou sans la reconnaissance ligand-récepteur. La vésicule pénètre dans le cytoplasme. Suite à l'endocytose, si les vésicules ne sont pas interceptées par le lysosome, leurs contenus peuvent être exocytés (12), c'est à dire expulsés à l'extérieur de la cellule. Si le mouvement des vésicules est polarisé, dans le cas de la BHE, ce mouvement ira de la circulation sanguine vers le tissu cérébral, il aboutit au transfert du cargo de part et d'autre de la barrière cellulaire. Les voies d'endocytose sont multiples et certaines sont impliquées dans la transcytose. Ces mécanismes seront détaillés dans la section 1.7.

La majorité des actifs thérapeutiques n'ont pas les propriétés physicochimiques nécessaires pour traverser le BHE par eux-mêmes. Différentes stratégies ont été envisagées pour pallier le problème posé par la BHE et pour administrer de façon efficace des principes actifs au cerveau. Ces stratégies seront discutées dans les sections suivantes. Néanmoins, les voies de passage possibles pour contourner le problème de l'imperméabilité de la BHE sont limitées.

1.1.2 Les voies qui contournent la BHE

Bien que la BHE soit l'interface principale entre le sang et le système nerveux central, il existe différentes voies d'entrée alternatives pour le SNC, que ce soit en modifiant les propriétés de la BHE ou en utilisant des voies mineures ou plus invasives (Tableau 1). Les voies de contournement principales sont les suivantes :

- *Perméabilisation de la BHE* : L'ouverture "artificielle" de la BHE permet de la contourner et d'apporter des principes actifs ou agents d'imagerie au cerveau. Différentes techniques ont été développées pour augmenter la perméabilité de la BHE telles que les ultrasons (13-16) la perturbation osmotique (17-19) ou la perturbation par un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire notamment le VEGF (20, 21) (Tableau 1).

La technologie la plus avancée pour la perméabilisation de la BHE est l'application localisée d'ultrasons combinée avec l'injection de microbulles par voie intraveineuse. Cette technologie provoque une perturbation temporaire et localisée de la BHE. Papachristodoulou *et al.* ont démontré que l'accumulation de liposomes fluorescents dans l'hémisphère d'un cerveau de souris augmentait de 4 fois lorsque celui-ci était traité par les ultrasons (14). Un essai clinique de phase I de la perméabilisation de la BHE par application des ultrasons a été effectué chez 5 patients avec un gliome de grade avancé. Cet essai a montré une augmentation du contraste de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) de 15 à 50% de la tumeur pendant une vingtaine d'heures (15). Ceci indique une ouverture de la BHE dans la région tumorale et indique le potentiel thérapeutique de cette approche (15). Un autre essai clinique de phase 1/2a a démontré la sécurité et la faisabilité de l'approche par ultrasons (16).

La perturbation osmotique de la BHE par le mannitol, combinée avec l'administration par infusion cérébrale intra-artérielle (SIACI) de bevacizumab (un anticorps actif sur les gliomes) a été bien toléré chez 30 patients atteints d'un gliome malin récurrent. Cet essai clinique de Phase I démontre une efficacité prometteuse (22).

Finalement la perturbation temporaire de la perméabilité de la BHE par le VEGF améliore l'administration de gadolinium au cerveau dans un modèle murin illustrant l'intérêt de cette méthode pour l'administration cérébrale (21). Cette technologie n'a cependant pas encore atteint la phase d'essai clinique.

- *Voie nasale* : La voie intranasale permet de contourner la BHE et offre un accès rapide au cerveau. La voie intranasale est composée de deux voies, une voie intracellulaire et une voie extracellulaire. Les neurones récepteurs olfactifs sont les seuls neurones qui sont à la fois en contact avec le milieu extérieur et des afférentes dans le SNC. La voie intracellulaire est initiée par l'endocytose au niveau des dendrites des cellules neuronales olfactives situées à la surface externe de la muqueuse olfactive. Cette endocytose est suivie par un transport axonal vers les fentes synaptiques de ces cellules situées dans le bulbe olfactif où le

cargo endocyté peut être finalement exocytosé dans le SNC. Dans le mécanisme extracellulaire, le cargo est transporté en passant d'abord par les espaces intercellulaires de l'épithélium nasal, puis par l'espace périneural par l'intermédiaire des espaces le long des nerfs olfactifs qui permettent la diffusion vers le liquide céphalo-rachidien, vers les vaisseaux lymphatiques ou sanguins (23).

- *Injection intracérébrale* : L'injection directe des médicaments dans le liquide cérébro-spinal sous les méninges (injection intrathécale) ou dans les ventricules cérébraux (injection intraventriculaire) permet de contourner la BHE (24-26) .

Les différentes stratégies pour traverser le BHE sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 1):

Tableau 1.1 : Différentes techniques proposées pour permettre le passage de molécules thérapeutiques à travers la BHE

Techniques	Principe	Phase de l'étude	Avantages	Inconvénients potentiels	Ref
Ultrasons	Application ultrasons pour un désassemblage temporaire des jonctions serrées	Essais cliniques Phase I ⁽¹⁵⁾ Phase 1/2a ⁽¹⁶⁾	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de l'administration des agents actifs au cerveau - Perméabilité transitoire de la BHE - Ouverture localisée de BHE - Sécurité et tolérance chez patients 	<ul style="list-style-type: none"> - Risque d'infections du cerveau - Risque de passage de molécules indésirables (27). - Risque l'induction une inflammation stérile (28). 	(13-16)
Perturbation osmotique de la BHE	Perfusion d'une solution hypertonique (ex: urée, arabinose, mannitol, etc.) en tant que perturbateur osmotique de la BHE, dans l' artère carotide unilatérale et désassemblage temporaire des jonctions serrées	Essais cliniques Phase I ⁽²²⁾	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de l'administration des agents actifs au cerveau - Perméabilité transitoire de la BHE 	<ul style="list-style-type: none"> - Œdème cérébral transitoire - Risque d'infections du cerveau - Risque de passage de molécules indésirables (27). 	(17-19, 22)
Perturbation de BHE par facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)	Faible dose de VEGF injectée par voie systémique induit une augmentation transitoire de la perméabilité de la BHE	Préclinique Modèle murin	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la libération des actifs au cerveau - Perméabilité transitoire de la BHE 	<ul style="list-style-type: none"> - Risque d'infections du cerveau - Risque de passage de molécules indésirables 	(20, 21)
Injection intracrânienne	Injection intracérébrale pour administrer le médicament directement dans le parenchyme cérébral.	Préclinique Modèle murin	<ul style="list-style-type: none"> - Biodisponibilité de la dose injectée 	<ul style="list-style-type: none"> - Exige une chirurgie-Invasif - Administration très localisée 	(24-26)

Techniques	Principe	Phase de l'étude	Avantages	Inconvénients potentiels	Ref
Administration par voie nasale	<u>Voies nasales directes:</u> - Nerf trijumeau - Muqueuse olfactive <u>Voies nasales indirectes:</u> - Voies respiratoires et circulation sanguine	Préclinique Modèle murin	- Non invasive - Contourner la BHE	- Difficile d'administrer des doses exactes au cerveau - Certains agents thérapeutiques peuvent dégrader la muqueuse nasale et provoquent une irritation de la muqueuse surtout lors d'utilisation fréquente	(29, 30),(31)
Prodrogue	Les « prodrogues » sont des molécules greffées à un médicament qui améliorent le passage à travers la BHE	Essais cliniques Phase II ⁽³²⁾	- Non invasive - Améliorer le passage de médicaments à travers la BHE	- Inactivité du principe actif conjugué - Libération incomplète du principe actif	(17-19)
Nanovecteurs Synthétiques	Transport de molécules encapsulées dans un vecteur nanoparticulaire capable de passer à travers la BHE (voie principale : la transcytose)	Essais cliniques	- Réduire la toxicité et les effets secondaires du principe actif - Empêcher la dégradation du principe actif - Possibilité de ciblage actif en greffant des ligands spécifiques	- Faible biodistribution au cerveau	(31),(33)

1.1.3 Les nanoparticules pour traverser la BHE

Dans une perspective clinique, le choix de la voie la moins invasive se justifie du point de vue pratique et du point de vue du confort du patient. Les voies à travers la BHE intacte sont donc à favoriser par rapport aux méthodes la contournant. Cependant, tel que discuté, la plupart des voies disponibles ne sont pas applicables pour les molécules complexes, de grandes tailles (>500D), fragiles ou toxiques. Pour cela, une stratégie permettant de traverser la BHE de façon efficace à partir de la circulation sanguine est nécessaire.

Parmi les différentes stratégies développées pour administrer ce type de molécules au cerveau à travers la BHE, les nanovecteurs particuliers pourraient être une solution envisageable. En effet, l'encapsulation des agents thérapeutiques ou d'imagerie dans des nanovecteurs améliore leur dispersibilité dans les matrices biologiques et en conséquence pourrait contourner le problème d'une solubilité limitée (34). Les nanovecteurs pourrait protéger les substances pharmaceutiques encapsulées contre la dégradation (35). Dans la plupart des cas, les nanovecteurs pourraient réduire également les effets toxiques systémiques des principes actifs (34). La stabilité colloïdale et l'intégrité physique des nanovecteurs NPs sont primordiales pour leur assurer une longue présence dans la circulation sanguine. L'amélioration du temps de résidence des nanoparticules dans le sang favorise l'effet de perméabilité et de rétention (effet « EPR ») des NPs dans les tissus tumoraux. Cet effet est surtout très important pour les applications liées au cancer (69).

Bien que les NPs soient des objets de taille bien supérieure à la plupart des molécules transportés par la BHE, leur design rationnel pourrait améliorer leur passage à travers la BHE intacte par l'intermédiaire des mécanismes naturels d'endocytose et transcytose (36). En effet plusieurs NPs naturelles et physiologiques peuvent traverser la BHE par des mécanismes de transcytose, soient les transporteurs de lipides, les LDL (37); certains virus comme HIV (38, 39) ainsi que les vésicules extracellulaires (40-42), plusieurs types de nano vecteurs biomimétiques ont été développés et testés dans cette perspective.

1.2 Les principaux types de nanovecteurs

1.2.1 Nanogels

Les nanogels sont des gels constitués de polymères hydrophiles, mis sous la forme de particules sphériques de taille nanométrique. Leur structure hydrophile les rend capables d'emprisonner de grandes quantités d'eau dans leurs réseaux (43). La composition chimique, la structure de la matrice polymère du gel et son degré de réticulation, ainsi que des variables environnementales telles que la température, le pH et la force ionique contrôlent les propriétés de gonflement/dégonflement des nanogels. Selon leur design, ils peuvent répondre à différents stimuli chimiques ou biologiques afin d'assurer des libérations contrôlées de principe actif. L'utilisation des nanogels pour l'administration de médicaments destinés aux maladies du SNC a été étudiée sur les différents modèles *in vivo* et *in vitro* (44) (45).

1.2.2 Dendrimères

Les dendrimères sont des molécules ayant une structure ramifiée de taille nanométrique bien définie. Les dendrimères possèdent une architecture moléculaire composée de trois domaines: 1) un noyau central; 2) des branches (« les dendrons ») ; 3) des groupes fonctionnels terminaux. Les dendrimères peuvent être utilisés comme un système d'administration de principes actifs de trois façons différentes (Figure 1.2 C). Les médicaments peuvent être (1) piégés physiquement à l'intérieur du dendrimère; (2) adsorbés à la surface du dendrimère par des forces d'interactions intermoléculaires ; (3) attachés par une liaison covalente au dendrimère (46). Les dendrimères ont été envisagés en tant que solution pour l'administration des médicaments au cerveau (47-49).

À ce jour les recherches effectuées sur les nanogels et les dendrimères demeurent au niveau de la recherche académique et ces technologies n'ont pas encore la maturité nécessaire pour atteindre les essais cliniques. Les autres types de nanovecteurs présentés à la suite de cette section sont des technologies plus matures, certaines sont commercialisées et certaines autres ont atteint les essais cliniques de différentes phases.

1.2.3 Liposomes

Les liposomes sont des vésicules artificielles constituées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques qui permettent de séparer un milieu intravésiculaire du milieu extérieur.

Les phospholipides s'organisent sous forme de vésicules sphériques en milieu aqueux à une température supérieure à leur transition de phase. La forme sphérique des liposomes permet de minimiser les interactions entre les parties hydrophobes et les molécules d'eau (50). Les liposomes peuvent encapsuler des médicaments hydrosolubles dans leur espace aqueux et des médicaments liposolubles dans la membrane lipidique. Les liposomes libèrent leur contenu par l'interaction avec les cellules par trois mécanismes possibles : 1) L'endocytose ; 2) L'échange lipidique entre la membrane des cellules et des liposomes; 3) La fusion du liposome avec la membrane cellulaire (51). Les liposomes peuvent être modifiés ou non par des chaînes de poly(éthylène glycol) aux fins de stabilisation en milieu biologique (2). Il est également possible de fonctionnaliser la surface de liposomes pour un ciblage sélectif (52). Plusieurs études rapportent l'utilisation des liposomes pour le traitement de maladies du SNC telles que l'Alzheimer (53), Parkinson (54), les tumeurs gliales (55), les accidents vasculaires cérébraux (56) dans les modèles animaux.

Parmi les formulations liposomales développées, le Doxil® a atteint la phase de commercialisation en 1995 (57). Le Doxil® (Caelyx® au Canada) est une formulation liposomale PEGylée qui encapsule de la doxorubicine. Doxil® est utilisé pour le traitement du cancer du sein, cancer des ovaires, cancers de l'utérus, cancers du poumon et le myélome multiple (57-59). Onivyde® est une autre formulation liposomale approuvée par la FDA en 2015 pour le traitement du cancer du pancréas (60).

1.2.4 Nanoparticule lipidique solide

Une nanoparticule lipidique solide est généralement un objet sphérique. Les NPs lipidiques solides se caractérisent par une matrice lipidique solide à température ambiante. Elle est composée d'une matrice lipidique qui est capable d'encapsuler une molécule hydrophobe. Le noyau lipidique peut être stabilisé par des surfactants (61). Plusieurs études rapportent l'application des NPs lipidiques solides destinées au traitement des maladies du SNC telles que glioblastome (62), Alzheimer (63) Parkinson (64) dans plusieurs modèles animaux.

Le patisiran (Onapattro™) est une formulation à base de NPs lipidiques encapsulant un ARN interférant double brin. Cette formulation a reçu une autorisation de mise sur le marché par la FDA en 2018 pour le traitement des patients atteints d'amyloïdose héréditaire à

transthyrétine, une maladie rare évolutive touchant le cœur, le système nerveux périphérique et central (65).

1.2.5 Micelles

Les micelles se forment à partir de molécules amphiphiles ou de polymères diblocs. Les polymères amphiphiles s'assemblent spontanément lors d'un mélange dans des solutions aqueuses à une concentration supérieure ou égale à leur concentration micellaire critique (CMC). Les chaînes de polymères individuelles qui forment les micelles sont en équilibre dynamique avec des chaînes qui restent dans la solution (66).

Plusieurs paramètres, tels qu'une dilution importante au-dessous de la CMC, un changement du pH, une variation de la concentration saline ou encore un contact avec les protéines complexes (surtout les protéines amphiphiles) peuvent influencer la stabilité des micelles. Les micelles doivent rester intactes pour empêcher la libération du principe actif avant d'atteindre les cellules cibles (67-69). Les micelles peuvent être fonctionnalisées avec les ligands spécifiques tels que transferrine (70), acide folique et Glucose (71), Tocopheryl Poly(éthylène Glycol) Succinate (TPGS) (72), qui pourrait améliorer leur passage à travers la BHE.

1.2.6 Nanoparticules polymères

Les nanoparticules polymères (NPs) résultent de l'assemblage de plusieurs chaînes de polymères pour former des structures sphériques dont les propriétés dépendent de celles des matériaux utilisés et de leur mode d'assemblage. Les NPs polymères se distinguent des micelles. Les NPs peuvent être préparées à partir de différents types de polymères. Parmi ceux-ci, les polymères diblocs possédant un bloc hydrophobe de taille suffisante peuvent former des agrégats sphériques de type micellaire. Contrairement au cas des petites molécules tensioactives qui forment les micelles dynamiques, dans le cas des NPs polymères, l'échange entre les polymères intégrés dans les particules et les polymères libres dans la solution se produit sur des échelles de temps extrêmement longues qui ne permet pas de mesurer une CMC. De façon pratique, l'équilibre est dit « cinétiquement figé » (70). Le mécanisme de formation des nanoparticules polymères à partir de polymères diblocs est détaillé dans la section 1.4.

Parmi les différents nanovecteurs proposés, les NPs possèdent une bonne stabilité et une bonne biocompatibilité (73). Ce type de nanoparticules présente une bonne stabilité colloïdale et également une bonne stabilité physique soit le maintien de leur intégrité physique dans les milieux biologiques (74-77) (78, 79).

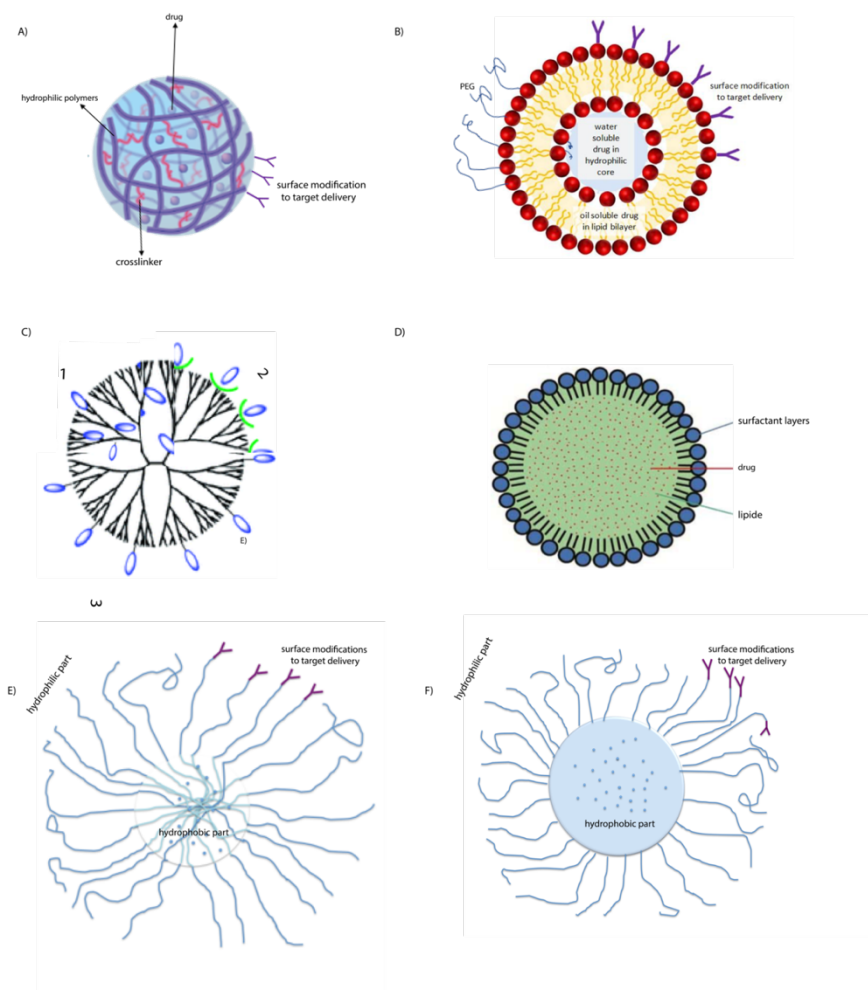


Figure 1.2 Représentation schématique de quelques nanovecteurs : (A) Nanogels tirée et adaptée de (80); (B) Liposomes (81); (C) Dendrimères, figure tirée et adaptée de (46); (D) Nanoparticules lipidiques solides (82); (E) Micelles (constituées de molécules de type surfactant), (F) Nanoparticules.

Dans le cadre de cette thèse, je me suis intéressée à ce dernier type de vecteurs.

Les polymères synthétiques dégradables sont des matériaux de base pour développer les nanoparticules polymères solides. Parmi ceux-ci, les plus étudiés au point de vue des

applications pharmaceutiques sont les polymères de type polyesters et leurs dérivés. Ces polymères peuvent être dégradés par des phénomènes chimiques (hydrolyse en milieu aqueux des liaisons esters) ou par des phénomènes biologiques, soient des dégradations enzymatiques (83-86) . Les polymères sensibles aux phénomènes biologiques sont dits « biodégradables ».

1.3 Les polymères synthétiques biodégradables

1.3.1 Les polyesters

Des polymères synthétiques biodégradables sont utilisés dans la préparation de nanoparticules pour des systèmes d'administration de médicaments (Figure 1.3). Parmi les polymères biodégradables, les polyesters tels que le Poly(caprolactone) (PCL), le Poly(lactique) (PLA), et le poly(lactique-co-glycolique) (ou PLGA) sont les polyesters qui ont été le plus étudiés.

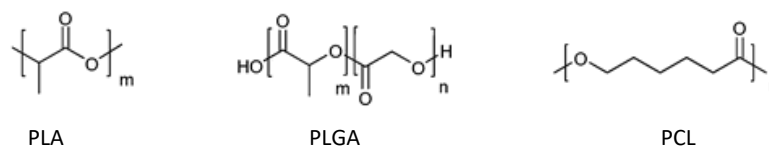


Figure 1.3 La structure chimique des polyesters: polylactide (PLA), poly (lactide-co-glycolide) (PLGA), poly(ε-caprolactone) (PCL).

Ces polymères biodégradables présentent différents avantages. La liaison ester des polyesters peut être hydrolysée en milieu aqueux par dégradation hydrolytique. Cette hydrolyse peut être accélérée en présence d'enzymes telles que des lipases (83, 84) protéinase K (87, 88).

Les produits de dégradation ne sont pas toxiques ou sont complètement éliminés de l'organisme par les voies métaboliques naturelles (89). Leur vitesse de dégradation peut être ajustée en fonction de la nature des monomères et leur ratio, la taille des chaînes de polymère ainsi que l'architecture des polymères (90). Les polyesters forment des matrices hydrophobes pour lesquelles on peut obtenir une charge en principe actif hydrophobe élevée, typiquement supérieure à 10% (78). La charge en principe actif (« drug loading ») est définie comme le ratio entre le principe actif présent dans la matrice et le poids total de la matrice incluant tous les ingrédients ajoutés. Cependant, ces polymères forment des NPs solides avec une faible stabilité

colloïdale en milieu salin. Autrement dit, ces NPs sans aucun autre excipient tel que les surfactants sont très susceptibles à l'agrégation en milieu salin (voir 1.5.2) (77).

Les NPs polyesters en l'absence d'une couronne flexible et très hydrophile, telle que celle formée par le poly(éthylène glycol) (PEG), ont des surfaces hydrophobes qui favorisent l'adsorption non spécifique de protéines sur leurs surfaces (91). L'adsorption des protéines favorise la reconnaissance des NPs par le système réticulo-endothélial (ou «mononuclear phagocytic system») et les éliminations rapides des NPs (92),(93). L'élimination précoce de ces NPs ne permet ni la libération contrôlée ni le ciblage efficace des médicaments (94).

Les polyesters peuvent être chimiquement modifiés pour améliorer les propriétés pharmacologiques des NPs. Les NPs préparées à base de copolymères de type dibloc montrent une meilleure stabilité colloïdale et une meilleure stabilité en milieu biologique ainsi qu'un temps de résidence dans le sang supérieur (5). Pour ces raisons, les copolymères diblocs sont utilisés pour le développement des systèmes de livraison de médicament.

1.3.2 Les polymères diblocs

Les polymères diblocs sont composés d'un bloc hydrophile associé à un bloc hydrophobe. La partie hydrophile telle que poly(éthylène glycol) (PEG) (92), dextran (95) ou poly(N-vinyl-pyrrolidone) (PVP) (96) forment un revêtement hydrophile à la surface des NPs. Ces revêtements hydrophiles en créant un effet stérique à la surface de NPs améliorent la stabilité colloïdale. Ils réduisent également l'adsorption des protéines et diminuent l'élimination des NPs par les macrophages.

Étant donné que les chaînes de PEG sont plus flexibles que les chaînes de dextran, (97), elles occupent un grand nombre de conformations possibles ce qui conduit à une compression temporaire des molécules d'eau qui rend la surface imperméable à d'autres solutés tels que les protéines plasmatiques. En conséquence, les NPs revêtues de PEG circulent plus longtemps dans le sang que les NPs revêtues de dextran (95, 97).

L'effet du revêtement de type PVP sur l'adsorption des protéines et la phagocytose des NPs à base de poly(D, L-lactide) a été évalué *in vitro* et *in vivo*. Le revêtement de PVP a été également comparé avec le revêtement de PEG. Les NPs revêtues d'une couche de PVP

présentent des temps de circulation considérablement plus courts que leurs homologues PEGylés chez le rat. Cette différence est reliée à un profil d'adsorption différent tant aux niveaux quantitatifs que qualitatifs des protéines plasmatiques entre les deux formulations (96).

Le PEG est le revêtement le plus étudié et utilisé au niveau clinique. Il existe plusieurs formulations PEGylées approuvées par la FDA (98),(99). Le PEG est considéré comme le matériel de référence (« gold standard ») des polymères hydrophiles pour les revêtements des NPs, prolongeant également la durée de circulation des NPs beaucoup plus que les autres polymères hydrophiles mentionnés plus haut (100).

La taille du bloc hydrophobe polyester est déterminante pour former soit des micelles, des agrégats micellaires ou des particules solides (101),(74),(102). La frontière entre particules solides et agrégats micellaires est mince. Les agrégats micellaires se distinguent des particules solides en microscopie électronique à transmission (MET), comme des particules déformables (102). Les agrégats micellaires (« micelle-like assemblies ») ont été aussi caractérisés par le fait que leur taille ne dépend pas de la concentration en copolymère lors de la nanoprécipitation (101). Les PLGA et PLA sont les blocs hydrophobes principalement utilisés pour la préparation des NPs pharmaceutiques tant en recherche que dans les tests cliniques actuellement en cours (78, 103-107).

Un exemple concret des systèmes à base de copolymères PLA-PEG est BIND-014 développé par BIND Therapeutics, qui est constitué de NPs solides. Cette formulation encapsulant l'anticancéreux Docétaxel avait atteint la phase II des essais cliniques pour le traitement de divers types de cancer du poumon, cancer de la prostate, cancer du col utérin, cancer de la tête et du cou et formes métastatiques de cancer (103-107). Cependant, les études ont été discontinuées du fait du faible taux de réponse pour certains cancers et une stratégie d'essais cliniques mal conçue (108).

1.3.3 Les différentes approches de synthèse des polymères diblocs

Deux approches ont principalement été appliquées pour la synthèse des polymères diblocs, soient les réactions de couplage et les réactions de polymérisation.

1.3.3.1 Réaction de couplage

Plusieurs types de réactions de couplage sont possibles pour former des diblocs telles que les réactions d'estérification ou d'amidification. Ces réactions de couplage ont lieu entre une fonction alcool (OH) ou amine (NH_x) sur un bloc polymère et une fonction acide carboxylique (COOH) sur l'autre bloc polymère. Les agents de couplage utilisés le plus fréquemment sont les carbodiimides tels que le Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en présence de DimethylAminoPyridine (DMAP) (109) ou encore 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide associé avec le N-hydrosuccinimide (110). La figure 1.4 est un exemple de réaction couplage entre Cap-PLGA-OH et MeO-PEG-COOH en présence d'un agent de couplage.

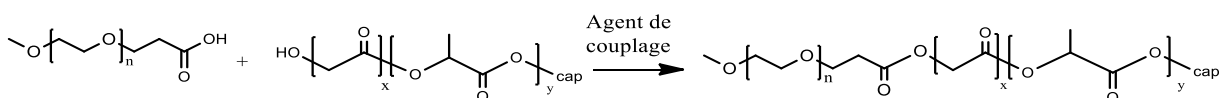


Figure 1.4 Réaction de couplage pour former un dibloc de type PLGA-*b*-PEG.

La principale limitation de ces approches de synthèse est que le faible taux de greffage est de l'ordre de 30% pour le PEG 2kDa. De plus, les taux obtenus sont peu reproductibles (111).

1.3.3.2 Réactions de polymérisation par ouverture du cycle

Les polymères diblocs PLA-*b*-PEG_x peuvent être synthétisés par la polymérisation par ouverture de cycle (POC ou « ROP » en anglais). La polymérisation a lieu par ouverture du cycle du monomère diester cyclique du lactide ou du glycolide en présence de catalyseurs. Le mPEG-OHs joue alors le rôle de macro-initiateur de la réaction.

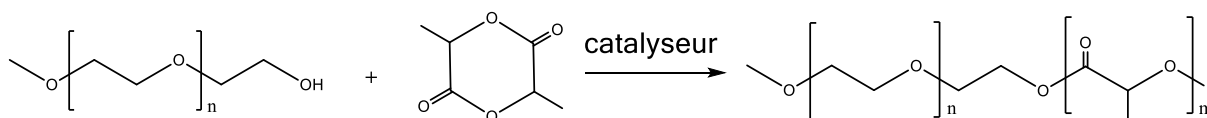


Figure 1.5 La polymérisation par POC initié par mPEG-OH en présence de catalyseur pour former un dibloc PLA-PEG_x.

L'octoate d'étain est un catalyseur fréquemment utilisé pour la réaction POC. Cependant, les catalyseurs à base d'étain produisent des polymères avec des polydispersités (PDI) élevées (112). Le terme polydispersité est couramment employé bien que l'IUPAC ait recommandé l'utilisation du terme « dispersité de la masse molaire » (\mathfrak{D}), définie comme le ratio M_w/M_n , respectivement masse molaire moyenne en poids et masse molaire moyenne en nombre (113). L'application de l'octoate d'étain soulève également la question de la toxicité potentielle des résidus de ce catalyseur métallique après purification du polymère (114). La polymérisation en présence de l'octoate d'étain se déroule normalement à haute température, de 120 à 170°C (102).

Le 1, 8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-ène (DBU) est une base organique de faible nucléophilie qui a été utilisée en tant que catalyseur pour les réactions de type transestérification. La haute activité de DBU en fait un catalyseur convenable pour la synthèse du PLA-b-PEG avec masse molaire bien contrôlée et une PDI faible (115). De plus, la polymérisation catalysée par DBU se déroule en solution, à température ambiante. La possibilité d'effectuer la réaction de polymérisation à température ambiante peut être considérée comme un grand avantage pour des macroinitiateurs qui sont sensibles aux hautes températures (112).

1.4 Méthodes de préparation des Nanoparticules

La fabrication des NPs à partir d'une solution de copolymères en blocs peut être effectuée par différentes méthodes. Les méthodes de préparation des NPs sont classées en méthode à deux étapes ou méthode à une étape.

1.4.1 Méthodes de préparation des NPs en deux étapes

Les méthodes de préparation des NPs à deux étapes consistent à la formation préalable d'une émulsion stable, puis à l'élimination du solvant organique. L'émulsion stable est formée en ajoutant une solution organique de polymère dans une solution aqueuse. Les solvants organiques utilisés pour former une émulsion sont non-miscibles à la phase aqueuse. Pour former cette émulsion, l'implication d'une source énergie externe est nécessaire (116). De plus, l'utilisation de surfactants ou de stabilisants stériques est nécessaire pour stabiliser l'émulsion. La solidification de la particule a lieu par l'élimination progressive du solvant organique qui se produit suite à sa diffusion dans la phase aqueuse et son évaporation. Les solvants organiques utilisés dans la préparation des NPs par « l'émulsion/évaporation de solvant » généralement sont

des solvants dont la concentration doit être limitée dans les produits pharmaceutiques (117). Par exemple dans le cas de Dichlorométhane (solvant de classe 2), la limite journalière adsorbée par un patient doit être inférieure à 6mg/jour ou 600ppm. Les étapes de purification sont donc primordiales.

La technique « émulsion/évaporation de solvant » présente deux défis importants. Premièrement, cette technique exige d'utilisation de surfactants qui ne sont pas faciles à éliminer. Également, ils peuvent entraîner des altérations sur les résultats des essais biologiques (118). De plus, les solvants organiques utilisés pour former les NPs sont principalement des solvants de classe 2, dont les quantités doivent être systématiquement analysées en vue d'une application biomédicale. Pour ces raisons, l'émulsion/évaporation n'est pas la technique retenue dans cette thèse.

1.4.2 Méthodes de préparation des NPs à une étape

Le procédé de nanoprécipitation consiste à injecter, une solution de polymère hydrophobe solubilisé dans un solvant organique miscible à l'eau telle que l'acétone, le DMSO ou le THF, dans une phase aqueuse (119),(120).

Le mécanisme de formation des NPs a été expliqué par deux théories. La formation de NPs pourrait être expliquée en termes de turbulence interfaciale ou d'agitation spontanée de l'interface. Les différences de tension de surface entre les deux solvants suscitent ces turbulences qui amènent à la formation de microgouttelettes. Dans ce mécanisme, la diffusion du solvant crée une zone super-saturée près de l'interface et des NPs se forment en raison de l'agrégation des chaînes de polymères (121).

Dans la seconde théorie, lorsque la solution de polymère est en contact avec de l'eau, la diffusion du solvant dans la phase aqueuse crée aussi une zone de « supersaturation » qui conduit à une nucléation spontanée menant à la formation de NPs par la croissance des « nucleus ». Les noyaux sont formés au-dessus d'une concentration critique de polymère (Étape de nucléation). Par la suite, les polymères amphiphiles s'insèrent dans les noyaux formés jusqu'à atteindre une barrière d'énergie trop élevée pour une nouvelle insertion (Étape de croissance) (45). Les NPs solides sont « cinétiquement figées » en enlevant le solvant organique ou en ajoutant de l'eau (45, 46). De surcroît, un phénomène de coalescence peut avoir lieu tel que mis en évidence par

García *et al.* alors que les particules plus petites peuvent fusionner pour former des particules plus grosses, mais plus stables (121).

La nanoprécipitation présente des avantages évidents par rapport à l'émulsion/évaporation de solvant. La nanoprécipitation est une technique simple et reproductible qui produit des NPs avec une distribution de taille plus étroite (faible indice de polydispersité ou PDI). Les solvants organiques utilisés sont beaucoup moins toxiques et pharmaceutiquement plus acceptables. La nanoprécipitation n'exige pas d'apport d'énergie sous la forme d'homogénéisation à haute pression ou d'ultrasons. De plus, la nanoprécipitation, à part pour des polymères hautement hydrophobes, n'exige pas l'utilisation de molécules stabilisatrices.

Il existe différents types de nanoprécipitations: la nanoprécipitation classique (102),(122), la nanoprécipitation « flash » (123),(122) et la microfluidique (124). Ces techniques se distinguent principalement par la vitesse de mélange des phases organiques et aqueuses, ce qui a des effets sur les tailles obtenues et la dispersité. Parmi les différentes techniques de nanoprécipitation, la nanoprécipitation classique est la plus facile à mettre en œuvre dans un laboratoire et elle n'exige pas d'équipement ou d'installation particulière. La nanoprécipitation classique est la technique utilisée dans le cadre de cette thèse.

1.4.3 Paramètres de nanoprécipitation à contrôler

Différents paramètres de nanoprécipitation peuvent influencer sur la taille des NPs.

1.4.3.1 Concentration de polymère dans la phase organique

La taille des NPs augmente avec la concentration de polymère dans la phase organique. Cette augmentation augmente la viscosité de la phase organique, ce qui rend plus difficile la diffusion du solvant et en conséquence, la phase de croissance des NPs est allongée, permettant d'obtenir des particules de taille supérieure (120).

1.4.3.2 Vitesse du mélange des phases organiques et aqueuses

Une augmentation de la vitesse d'agitation entraîne généralement une diminution de la taille des particules (125). Ceci s'explique par le fait que la vitesse de mélange plus élevée

améliore la diffusion du solvant organique vers la phase aqueuse. Ceci diminue la durée de la phase de croissance des NPs.

1.4.3.3 Masse moléculaire des polymères

Blouza *et al.* ont observé qu'une augmentation de la taille des particules, est liée à une augmentation de la masse moléculaire du polymère. Une masse moléculaire plus élevée augmente la viscosité de la phase organique et en conséquence la diffusion du solvant est ralentie ce qui favorise aussi la phase de croissance des NPs (126). Legrand *et al.* ont montré que la masse molaire du PLA en l'absence de tensioactif n'influence pas la taille de NPs. En revanche, ils ont constaté que le rendement de formation des NPs et leur polydispersité étaient grandement influencés par la masse molaire du polymère. Dans le cas du PLA et en l'absence de tensioactif, on observe une plage optimale de masse molaire pour former des NPs stables. Au-dessus de la plage optimale de masse molaire, le PLA précipite sous forme d'agrégats et contribue à réduire le rendement de la production des NPs (127).

1.4.3.4 Rapport de poids entre le bloc hydrophile et hydrophobe

Dans le cas des polymères diblocs, le rapport de poids entre les blocs hydrophiles et hydrophobes détermine la nature des NPs formées (micelles, agrégats micellaires ou NPs solides). Par exemple, Rabanel *et al.* ont montré qu'en faisant varier la quantité de PEG (% poids) dans un copolymère possédant un bloc hydrophobe PLA, on obtient une variabilité dans la taille et la nature des particules obtenues par nanopréciipitation (119). Le contenu de PEG (% poids/poids) en tant que bloc hydrophile dans le copolymère PLA-g-PEG conduit à bâtir deux régimes apparents: un régime avec des particules possédant un cœur solide (au-dessous de 10-15% w/w) et un régime agrégat micellaire, des particules molles (*soft particle*) au-dessus de 10-15% poids/poids en PEG (119).

1.5 Caractérisation des nanoparticules

1.5.1 La taille

La taille des particules et sa distribution sont des caractéristiques très importantes des NPs. Elles peuvent influencer le taux de chargement et la libération de médicament. En outre, elles déterminent d'importantes propriétés des NPs *in vivo* telles que leur biodistribution, leur toxicité, leur devenir biologique et leur capacité de ciblage. En plus des interactions des NPs

avec les tissus et les cellules, leur passage à travers les barrières endothéliales, l'efficacité de leur internalisation cellulaire dépend de la taille (128-130). Les voies d'endocytose des NPs sont également liées à leur taille (131). Les vésicules d'endocytose forment des vésicules de taille variant selon les voies de 50 à 100 nm (voir Section 1.7). La taille de la NP peut avoir une influence sur la voie d'endocytose empruntée. La translocation à travers la BHE est dépendante de l'endocytose. La taille des NPs destinées au ciblage de cerveau doit donc tenir compte.

La taille des NPs joue également un rôle important sur l'accumulation des NPs dans les tumeurs ou aux sites inflammatoires (132). L'accumulation des NPs dans les sites tumoraux ou inflammatoires est favorisée par effet EPR. Le passage des NPs dans les tissus est permis, car les vaisseaux sanguins y sont plus déstructurés et poreux (133). L'importance de l'effet EPR est favorisée par l'augmentation du temps de circulation dans le sang,

La taille optimale pour améliorer la demi-vie des NPs en circulation et diminuer les risques d'élimination par la rate et le foie est un diamètre inférieur à 100 nm. Le design de particules avec des diamètres supérieurs à 10 nm minimise également le risque d'élimination rénale (134). Il est possible de déduire qu'il y a une plage de taille optimale de NPs entre 10-100 nm pour obtenir une meilleure accumulation dans le tissu tumoral.

Méthodes de mesure

La méthode la plus rapide et la plus courante pour déterminer la taille des NPs est la technique de la diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS). La DLS est basée sur la mesure du déplacement des NPs sous l'effet du mouvement Brownien. Ce déplacement est mesuré par la variation de l'intensité de la lumière diffusée par les NPs. La variation d'intensité permet de calculer un coefficient de diffusion, qui détermine par la relation de Stokes-Einstein le diamètre hydrodynamique de la NPs (135).

La DLS permet de déterminer le diamètre hydrodynamique (D_H) des NPs. Ce diamètre représente la taille de la particule ainsi que l'ensemble des molécules liées à sa surface et se déplaçant de concert avec elle (136).

La taille obtenue par DLS est présentée en moyenne pondérée dite moyenne en Z. La moyenne en Z (*Z-average*) est un nombre que l'appareil calcule à partir des mesures brutes de l'intensité de la lumière diffusée par les particules. Le calcul normalise le résultat en fonction

de l'indice de polydispersité ou Pdl, une mesure de la largeur de distribution de la taille des NPs. Cette technique de mesure de la taille fonctionne bien lorsque les échantillons sont homogènes au niveau de la taille. La résolution de la DLS est faible pour distinguer les tailles d'une population hétérogène de NPs, si leur différence en taille est inférieure à une unité logarithmique.

La *Nanoparticle Tracking Analysis* (ou NTA) est une technique alternative qui permet de déterminer la taille de NPs par une analyse individuelle et simultanée du déplacement des NPs. La NTA visualise et analyse les particules dans des liquides et calcule la taille des particules individuellement (contrairement à la DLS qui donne une mesure sur l'ensemble des particules présentes dans la suspension) sur la base de leur coefficient de diffusion dû au mouvement brownien en utilisant la relation de Stokes-Einstein (137). Le NTA permet d'obtenir des distributions de tailles de particules à haute résolution et les populations hétérogènes peuvent être résolues. La mesure de la taille obtenue par NTA est rapportée par une mesure du diamètre hydrodynamique et un histogramme de fréquence.

Les différentes techniques de microscopie électronique telles que la microscopie électronique à balayage (MEB) ou la Microscopie électronique en transmission (MET) ont été appliquées pour déterminer la taille de NPs (138, 139). La MEB et la MET utilisent un faisceau d'électrons pour imager. La MEB crée une image en détectant les électrons réfléchis (électrons secondaires) par l'échantillon, tandis qu'avec la MET l'image de la particule est générée par les électrons qui traversent l'échantillon. La MET permet d'obtenir des informations sur la structure interne des particules. La MEB fournira de l'information sur la structure de surface. Les deux techniques peuvent donner des informations sur la morphologie et la taille des particules.

Les échantillons à analyser par MEB doivent être conducteurs. Dans le cas des échantillons non conducteurs tels que les NPs polymériques, ce problème pourrait être résolu par le dépôt d'un revêtement conducteur. Le dépôt d'une couche conductrice métallique telle que l'or ou le platine, améliore le contraste et la qualité des images. Par exemple des NPs de poly(butylcyanoacrylate) ont été ainsi imagées et mesurées par MEB suite à une pulvérisation d'une mince couche d'or à leur surface (140)

Les techniques de MET peuvent également s'appliquer si les NPs produisent un contraste suffisamment important en interagissant avec le faisceau d'électrons. Si les NPs sont labiles et sensibles aux rayonnements des électrons, les NPs polymères peuvent être visualisées en cryo-MET. Dans ce cas les NPs apparaissent sombres et plus contrastées sur fonds clair (102). Pour améliorer le contraste, les NPs peuvent être aussi incubées avec des sels de métaux lourds (Tungstène, Uranium), les NPs apparaissent alors claires sur un fonds sombre (141).

La taille des NPs mesurée par les techniques de microscopie est représentative des particules sous forme sèche, les mesures se faisant sous vide. Les mesures de taille obtenues par MEB ou MET sont plus petites que celles obtenues par DLS ou NTA, car ces dernières techniques mesurent des diamètres hydrodynamiques, alors que la MEB et la MET mesurent la taille du cœur de la particule (la couronne polymérique de surface n'est pas visible). Selon un rapport publié par le Bureau International des Poids et Mesures pour obtenir une bonne distribution statistique de la taille des NPs il faut compter au moins 500 NPs dans des zones bien séparées de l'échantillon (142). Le protocole développé par «The National Institute of Standards and Technology (NIST) » propose de nombre similaire d'acquisitions, autrement dit un minimum de 200 nanoparticules par carré de la grille à partir de deux régions au moins, largement séparées (143).

Les différentes techniques de mesure fournissent des informations différentes et complémentaires et chacune d'entre elles a des limitations. Par exemple la DLS donne la mesure du diamètre hydrodynamique sur un ensemble de particules en suspension; tandis que la microscopie électronique fournit le diamètre du cœur des particules de façon individuelle sur un échantillon limité, qui se présente sous forme d'un histogramme de fréquence (144). Pour obtenir l'information la plus complète sur la taille et la plus représentative de la réalité, il est important de combiner plusieurs techniques (145).

1.5.2 Charge de surface

Les charges de surface ont une influence importante sur la stabilité des nanosuspensions dans les milieux salins. Dans l'eau, la répulsion créée par les charges identiques sur la surface des NPs évite ou ralentit cinétiquement l'agrégation des NPs (146). Par contre, dans des milieux salins tels que les milieux biologiques, la présence de charge peut induire l'agrégation des

particules. En effet la présence d'espèces salines faisant un écran sur les charges de surface favorise le rapprochement des particules avec des charges identiques

Les charges de surface jouent également un rôle important sur la cytotoxicité des NPs (147). Les NPs inorganiques positivement chargées telles que les NPs d'or (148) et les NPs de silice (149) modifiées en surface induisent plus de cytotoxicité en comparaison de leurs homologues de taille similaire non chargées ou négativement chargées. L'importance de l'influence de la charge superficielle sur la toxicité des NPs a aussi été démontrée avec des NPs polymères. Ainsi les NPs de PLGA positivement chargées induisaient de la cytotoxicité et la production de plus de dérivés réactifs de l'oxygène (150).

Lorsque les charges de surface sont proches de la neutralité, les interactions électrostatiques avec les protéines sont limitées, ce qui réduit la vitesse d'élimination des NPs par les macrophages (151). Également, les charges de surface ont une incidence sur l'interaction des NPs avec les membranes cellulaires. Étant donné que les membranes cellulaires sont négativement chargées, l'hypothèse a été émise que les charges positives des NPs favorisent l'internalisation grâce à des attractions électrostatiques par rapport aux NPs neutres ou négativement chargées. Ceci a été montré en comparant l'internalisation de NPs telles que des NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPION) positivement chargées (152), des NPs de chitosan (153) ou des NPs de PLGA positivement chargées (150) avec leurs équivalents neutres ou négativement chargées. Les voies d'endocytoses empruntées par les NPs pourraient également être influencées par les charges de surface (154).

Méthodes de mesure

Le potentiel zêta (ζ -potentiel) se définit comme le potentiel électrique au plan de cisaillement d'une particule colloïdale se déplaçant dans un champ électrique (155). Il est important de noter que le potentiel zêta n'est pas une mesure de la charge en surface de NPs. Dans un milieu ionique, une couche constituée d'ions de charge opposée à la charge de surface de la particule se forme au voisinage immédiat de la particule. Cette couche ionique à son tour attire des contre-ions de charge opposée (et donc de même charge que la particule). Cette seconde couche ionique est appelée couche de diffusion (Figure 1.6). Les NPs en suspension se déplacent dans une solution conductrice sous l'influence d'un champ électrique appliqué et les

deux couches ioniques liées à la particule vont également se déplacer de concert avec la NP. Le plan de cisaillement se situe à la frontière entre ces couches liées à la particule et le cœur du liquide (*liquid bulk*). Le potentiel zêta est donc le potentiel électrostatique de la NP mesuré à cette interface (Figure 1.6).

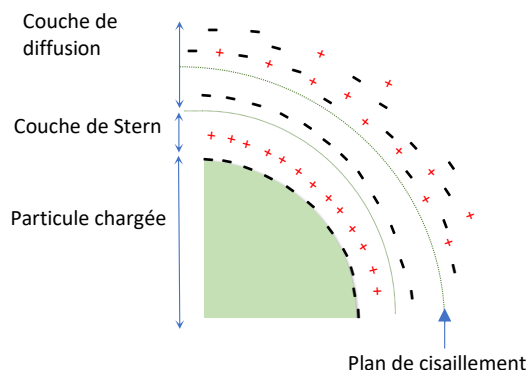


Figure 1.6 Double couche diffuse de solvation d'une particule chargée négativement

La mesure du ζ -potentiel dépend de la concentration en ions, du pH et du type de tampon utilisé. Pour pouvoir comparer adéquatement les lots de NP entre eux tous ses paramètres, doivent être contrôlés (156). La couche de PEG à la surface des NPs a un effet d'écran. La charge de surface des NPs PEGylées diminue avec l'augmentation de la longueur de la chaîne et la densité de chaîne de PEG (157, 158).

1.5.3 Composition chimique de surface

La surface des NPs détermine l'interaction des NPs avec les milieux biologiques. Plusieurs paramètres peuvent influencer les propriétés de surface des NPs.

Les chaînes polymériques hydrophiles en surface des NPs créent une répulsion stérique qui assure la stabilité en milieux salins. La surface hydrophile empêche les liaisons spécifiques aux protéines et donc diminue le risque d'opsonisation et l'élimination des NPs par les macrophages, prolongeant le temps de circulation des NPs dans le sang (95, 96).

La présence et la composition chimique du revêtement polymère hydrophiles à la surface des NPs influence la réponse inflammatoire (159) ou la réaction immunitaire à des NPs (160, 161).

Méthodes d'analyse

L'identification et la quantification de revêtement polymère en surface des NPs peuvent être obtenues par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Le signal de RMN est quantitatif sur une grande plage de concentrations. Par exemple, la couronne de PEG peut être analysée et quantifiée en dispersant les NPs dans un milieu deutéré (D_2O) avec un standard interne tel que Octamethylcyclotetrasiloxane, sel de 3-triméthylsilyl-1-propanesulfonate de sodium deutéré (102, 162). Cependant, la RMN ne permet pas de distinguer le PEG lié à la surface du PEG en suspension dans le milieu.

Une autre technique qui permet de déterminer la quantité totale de PEG (le PEG attaché aux NPs et le PEG libre) est l'analyse colorimétrique. La fonction éther de PEG interagit avec le thiocyanate de cobalt (II) et forme un complexe bleu quantifiable avec la spectroscopie UV-visible. Cependant la sensibilité de cette technique est limitée à la sensibilité de la spectroscopie UV-visible (163).

La composition chimique des NPs peut aussi être analysée de façon semi-quantitative par la spectroscopie de photon à rayon X (XPS). La profondeur d'analyse de la surface des NPs par XPS est entre 5 à 7 nm (102) (144). XPS permet d'évaluer la composition chimique de surface des NPs et la nature des différentes liaisons chimiques (164, 165). Dans le cas des NPs-PEGylés si les particules ne contiennent pas un autre composé avec les liaisons éther l'intégration du signal C-O-C est corrélée à la concentration massique de PEG (102, 166).

La spectroscopie de masse (TOF-SIMS ou « Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry ») est une technique connue pour l'analyse de la composition chimique de surface des NPs. La profondeur d'analyse par TOF-SIMS est inférieure à 1nm. Cette technique permet la détection des fragments moléculaire même à de très faibles concentrations (167). Ces deux techniques ne sont pas utilisées dans le cadre de cette thèse, car elles nécessitent une lyophilisation préalable des particules qui sont analysées dans le vide, ce qui modifie la structure de la particule.

En combinant plusieurs techniques analytiques, nous pouvons obtenir des informations plus précises sur la composition chimique de la surface des NPs.

1.5.4 Stabilité des systèmes nanoparticulaires

L'agrégation des NPs modifie considérablement le comportement *in vitro* tel que la cytotoxicité, l'endocytose et la transcytose, ainsi que leur devenir *in vivo*, modifiant la pharmacocinétique, la toxicité et la biodistribution des NPs (168).

La stabilité des nanosuspensions est conditionnée à la domination des forces de répulsion sur les forces d'attraction, telle qu'expliquée par la théorie Derjaguin—Landau—Verwey—Overbeek « DLVO » (169). Dans cette théorie, les charges de surfaces ont un rôle considérable. Les charges de surface et la répulsion stérique créée par les chaînes polymériques hydrophiles en surface des NPs empêchent l'agrégation des NPs initiée par les forces attractives telles que les interactions hydrophobes ou les forces de van der Waals.

Les charges de surface des NPs dans une solution saline en présence des contre-ions peuvent être neutralisées par un effet d'écran et en conséquence les forces de répulsion dues aux charges diminuent et le risque de l'agrégation augmente. Les milieux physiologiques contiennent l'équivalent de 154 mM de NaCl. Les NPs dans les milieux physiologiques sont donc exposées à des concentrations salines qui pourraient augmenter le risque d'agrégation.

Le design approprié de la surface des NPs, soit la composition chimique et l'organisation des chaînes en surface, permet de diminuer le risque d'agrégation. La stabilisation stérique est l'approche la plus courante pour augmenter la stabilité des NPs en suspension. Les polymères hydrophiles naturels tels que le dextran, l'alginate et le chitosan ou les polymères synthétiques tels que le PEG ou l'alcool polyvinylique (PVA) ou encore le PVP ont été utilisés pour améliorer la stabilisation stérique des NPs (168, 170, 171). L'étude de la stabilité des NPs des nanosuspensions en milieu salin est indispensable avant de faire l'étude *in vitro* ou *in vivo*.

Méthodes d'évaluation de la stabilité des NPs

La stabilité colloïdale des NPs peut être évaluée en mesurant la taille des NPs par DLS en fonction des forces ioniques. La stabilité des NPs peut être également évaluée dans les milieux de sérum simulé.

La concentration critique de coagulation ou de floculation (Critical Coagulation Concentration ou Critical Flocculation Concentration) peut être évaluée en augmentant

progressivement la concentration de sels dans le milieu de suspension et en mesurant la taille par DLS (102, 172, 173).

La stabilité des nanosuspensions peut être également évaluée en analysant le changement de la turbidité de la nanosuspension par Static Multiple Light Scattering (SMLS). L'analyse par SMLS consiste à suivre l'évolution des propriétés optiques de la nanosuspension, particulièrement de la transmission ou rétrodiffusion d'un faisceau lumineux par les particules en suspension, en fonction de la hauteur de l'échantillon. Différents mécanismes de déstabilisation tels que le crémage, la sédimentation, l'agglomération, l'agrégation et la coalescence peuvent se produire au cours du temps dans une nanosuspension. Ces phénomènes altèrent la transmission et la rétrodiffusion d'un faisceau lumineux dirigé à travers l'échantillon. Ces altérations peuvent être détectées par le SMLS.

1.5.5 Structure du cœur et morphologie des NPs

La structure du cœur de la NP peut influencer les propriétés mécaniques des NPs et en conséquence affecter les interactions des NPs avec des cellules. Le taux d'endocytose et la voie d'endocytose peuvent être affectés par les propriétés mécaniques des NPs (174, 175). L'efficacité d'endocytose dépend également de la morphologie des NPs (176).

Méthodes d'analyse de la structure des cœurs et de la morphologie des NPs

L'analyse de la structure interne et des surfaces de NPs polymère surtout les NPs «molles» comme les agrégats micellaires est un défi technique (144). La visualisation des NPs déposées sur un porte-échantillon refroidi par l'azote liquide par microscopie électronique transmission (cryo-MET) permet d'obtenir les informations sur les structures des NPs. L'imagerie par cryo-MET non seulement permet de déterminer la taille des NPs, mais également il est possible d'obtenir des informations sur la structure des cœurs de NPs. La cryo-MET a permis de démontrer que selon le contenu de PEG du polymère dibloc PLA-b-PEG, les NPs forment des cœurs solides ou des cœurs « mous » (102).

La topographie des particules peut être visualisée et analysée par microscopie de force atomique (Atomic Force Microscopy ou AFM). L'AFM peut être aussi une technique complémentaire aux techniques analytiques pour obtenir les informations sur la chimie de

surface (177). La microscopie électronique à balayage (Scanning electronic Microscopy, SEM) a été utilisée pour obtenir également des informations sur la morphologie des NPs (176).

Tableau 1.2 : Principales techniques de caractérisation des nanoparticules

Propriétés	Méthode	Principe physique	Information obtenue	Limitations
Taille	Diffusion dynamique de la lumière (« DLS »)	Mesure de la variation de l'intensité de la lumière diffusée par les particules	Diamètre Hydrodynamique	<ul style="list-style-type: none"> - Particule sphérique - Échantillon homogène - La taille généralement surestimée
	Analyse du suivi individuel de particules	La taille des particules est mesurée en fonction du taux de mouvement brownien	Diamètre Hydrodynamique	<ul style="list-style-type: none"> - Particule sphérique
	Microscopie électronique à balayage	un faisceau d'électrons balaye la surface des particules à analyser	Taille des NP	<ul style="list-style-type: none"> - Nombre élevé d'acquisitions pour obtenir des résultats statistiquement significatifs - Recouvrement de surface des NPs - Sensibilité des NP aux faisceaux d'électrons
	Microscopie Électronique à Transmission	Un faisceau d'électrons est « transmis » à travers des NPs	Taille des NPs par projection	<ul style="list-style-type: none"> - Nombre élevé d'acquisitions pour obtenir des résultats statistiquement significatifs - Analyse sous vide
	Impulsions résistives accordables (<i>Tunable Resistive Pulse Sensing, TRPS</i>)	Mesurer l'impulsion de courant transitoire produit par une particule traversant un pore. Ce courant est proportionnel au volume de la particule.	Taille des NP	<ul style="list-style-type: none"> - Échantillon doit avoir une conductivité électrique supérieure à $\sim 3 \text{ mS/cm}$ ⁽¹⁷⁸⁾

Propriétés	Méthode	Principe physique	Information obtenue	Limitations
Charge	Mesure du potentiel Zêta	Mobilité électrophorétique	Mesure relative du potentiel de surface	- Potentiel zêta est très influençable par conditions externes
	Résonance Magnétique Nucléaire	Signaux de résonance des protons ^1H	Quantification des entités chimiques	- Analyse dans le solvant deutéré
	Spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X	Le bombardement de la surface de l'échantillon par des photons X entraîne l'émission de photoélectrons dont les énergies sont caractéristiques des éléments chimiques qui se trouvent dans l'échantillon	Composition chimique relative en pourcentage	- Analyse semi-quantitative - Analyse effectuée sur les échantillons lyophilisés - Épaisseur d'analyse 5-10 nm (plus profonde que la surface de NPs)
	TOF-SIMS	Spectrométrie de masse de surface	Composition élémentaire ou moléculaire de l'échantillon	- Résolution 200 nm
Composition Chimique de Surface				

Propriétés	Méthode	Principe physique	Information obtenue	Limitations
Stabilité	Diffusion dynamique de la lumière	Mesure des variations du diamètre hydrodynamique des NPs en fonction de la variation de la lumière diffusée par les NPs	Mesure de la taille et la détection de la formation de l'agrégation	- Sensibilité faible - Analyse dans milieu biologique est très compliquée
	Turbiscan®	Mesure du changement de la transmission ou rétrodiffusion d'un faisceau lumineux par les NPs en suspension	Détection des phénomènes tels que le crémage, la sédimentation, l'agglomération, l'agrégation et la coalescence	- Sensibilité faible - Quantité importante de l'échantillon
Structure Interne	Microscopie électronique à transmission (MET)	Un faisceau d'électrons est « transmis » à travers des NPs	Visualisation des NPs	- Stabilité des NPs
	Microscopie électronique à balayage	un faisceau d'électrons balaye la surface des particules à analyser	Topographie de la surface de NPs	- Stabilité des NPs - Modification de la surface des NPs
Structure de la Surface	Microscopie de force atomique	Pointe oscillante interagissant avec la surface de NPs	Visualisation 3D et information sur la composition chimique de la surface	- Résolution limitée pour des particules nanométriques

1.6 Interactions avec le vivant : « l'interface nanobio »

Dans le projet de cette thèse, nous nous intéressons à l'utilisation des NPs pour la livraison de principes actifs à travers la BHE. Dans ce contexte, les NPs vont interagir avec les fluides biologiques (sang, liquide interstitiel des tissus); les cellules immunitaires circulantes, ainsi que les cellules vasculaires endothéliales de la BHE.

Les parties 1.6 (interface nanoparticules/milieu biologique) ainsi que 1.7 (endocytose) et 1.8 (transcytose) sont organisées de façon similaire de manière à présenter systématiquement l'effet de chacun des principaux paramètres physicochimiques des NPs (taille, charge, chimie de surface).

1.6.1 Couronne protéique : établissement et conséquences biologiques

La structure et la chimie des NPs sont dictées par la structure des polymères et la méthode de fabrication utilisée. Cependant dès que les NPs se retrouvent dans une matrice biologique, cette surface subit une transformation avec la formation d'une couronne de protéines (179),(180). Il semble que les protéines ne s'adsorbent pas de façon aléatoire, mais en fonction de la chimie de surface déterminée par les conditions fabrication et les conditions dans le milieu biologique. Cette couronne joue un rôle important, car elle constitue l'interface entre le milieu biologique et les particules. Ces protéines déterminent en grande partie le comportement de la particule, ses effets toxiques, l'activation du complément, les effets immunogènes, la biodistribution.

La couronne qui se forme à la surface des NPs est constituée d'une couche de protéines qui se lie étroitement, mais pas de manière totalement irréversible à la surface. C'est la couronne "dure" (hard corona). Au-dessus de cette couronne "dure", il y a une autre couche plus faiblement associée aux NPs (soft corona) (181).

La couronne de protéines est constituée majoritairement par des apolipoprotéines, des immunoglobulines et des protéines du complément (182). Les immunoglobulines et les protéines du complément sont appelées opsonines. La présence des opsonines à la surface des

particules crée une "signature moléculaire" reconnue par les cellules immunitaires et les cellules du système réticulo-endothélial (182). L'internalisation des NPs par les cellules immunitaires et les cellules de système réticulo-endothélial peut influencer le destin de la NP dans le corps. Plus précisément, les opsonines peuvent influencer le taux de la clairance de la circulation sanguine, la toxicité, la réponse immunitaire et la biodistribution des NPs (180, 181, 183). Les protéines de la couronne peuvent être catégorisées en quatre grands groupes.

1.6.1.1 Les protéines de système du complément

Les protéines du système du complément sont des protéines présentes dans le sérum et qui font partie du système immunitaire inné responsable de l'élimination des corps étrangers. Elles agissent en reconnaissant et se liant à la surface des corps étrangers et pathogènes potentiels. La façon dont les protéines du complément s'assemblent sur la surface des NPs n'est pas complètement connue (184). Il y a trois voies connues menant à l'activation du complément soit la voie classique (185), la voie alternative (184, 186) et la voie des lectines par la reconnaissance de structures glucidiques ou des structures polymères qui y ressemblent (187),(188). Les trois voies aboutissent à l'activation de la protéine C3 et son clivage dont les produits vont activer la reconnaissance des macrophages. Le clivage du facteur C3 en facteur C3a peut entraîner une réaction d'hypersensibilité aiguë chez les certains individus sensibles et induire la libération de facteurs proinflammatoires (189).

Les protéines du complément interviennent dans la clairance des NPs en favorisant la reconnaissance des NPs par les cellules phagocytaires. Cette conception classique du rôle du complément implique que la présence C3 en surface des NPs augmente le risque d'élimination des NPs par les macrophages (190). Cependant, des études effectuées sur les NPs PLA-PEG chez des souris déficientes en C3 démontrent que le temps de clairance des NPs n'est pas affecté par l'absence de C3. Ce qui suggère que l'activation du complément ne peut pas expliquer seule la vitesse de clairance des NPs (191).

1.6.1.2 Les immunoglobulines

La famille des immunoglobulines (Ig) est un groupe de glycoprotéines membranaires ou solubles qui peut exercer d'une fonction anticorps. Cinq classes d'immunoglobulines sont connues, dont les IgG et les IgM qui sont impliquées de façon plus directe dans les interactions avec des NPs. Elles participent dans les processus d'activation du complément C3 par la voie classique (185). La présence de ces anticorps à la surface des NPs favorise également l'élimination des NPs par les cellules phagocytaires par la réponse immunitaire adaptative. À titre d'exemple, il a été démontré que les souris qui présentent des IgM dirigés contre le PEG ont une clairance des NPs PEGylées plus rapide (160).

1.6.1.3 Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines (Apo) sont les constituants protéiques des lipoprotéines. Les lipoprotéines comportent un cœur hydrophobe constitué de lipides recouverts d'une couche externe polaire. Ils participent notamment à transporter les lipides et les molécules hydrophobes dans le sang. Cette classe de protéines de la couronne influence l'interaction des NPs avec le vivant à différents niveaux (192). Il a été démontré que les ApoE peuvent ralentir la clairance des NPs de PLA possédant une faible densité de surface en PEG (191). L'ApoJ fonctionne comme une dysopsonine et diminue l'internalisation des NPs PEGylées par les macrophages et favorise l'effet de furtivité des NPs *in vitro* (193, 194). Il a été montré également que les NPs avec une surface modifiée par ApoE s'accumulent plus dans le cerveau par l'intermédiaire d'une reconnaissance ligand-récepteur au niveau de la BHE (195),(196).

1.6.1.4 Autres protéines

Bien que plus d'une centaine de protéines ont été identifiées dans la couronne protéique de différents types de NP, les rôles de toutes ces protéines ne sont pas encore bien définis au niveau de l'interaction avec le vivant (190). L'albumine est la protéine la plus abondante dans le plasma qui peut adhérer à la surface de NPs rapidement, mais transitoirement. Elle peut être remplacée par les autres protéines ayant plus d'affinité pour la surface des NPs (197). Les protéines telles que le fibrinogène et la fibronectine qui sont des médiateurs majeurs de

l'agrégation plaquettaire peuvent se retrouver sur la surface des NPs. Potentiellement, ils peuvent initier une thrombose (198).

1.6.2 Paramètres physicochimiques des NPs et couronne protéique

La taille des NPs affecte de manière significative la composition de la couronne de protéines ainsi que la quantité des protéines liées à la surface des NPs ((199). Shannahan *et al.* ont montré que les NPs d'argent de 110 nm liaient plus de protéine que les NPs de 20nm. De plus les NPs de 20 nm lient des protéines plus hydrophobes que les plus grosses particules, soulignant le rôle du rayon de courbure sur l'adsorption des protéines (200) . Les études les plus importantes ont été réalisées sur des NPs d'or PEGylées. Walkey *et al* ont montré que la taille module l'absorption de protéine en modifiant les interactions entre chaînes de PEG. Elles montrent une augmentation de l'absorption des protéines avec la diminution de taille (190). Cependant selon le type de NP considéré, des résultats inverses ont été montrés, notamment pour des liposomes *in vivo* pour lesquels il a été démontré que l'opsonisation diminuait avec la taille, de 800 à 200 nm (201). Il a été également démontré qu'une configuration géométrique appropriée pour une activation efficace du complément peut être atteinte plus difficilement sur la surface plus incurvée des liposomes les plus petits, vésicules de 400 nm versus 50 nm (202).

García-Álvarez *et al.* ont relaté que la forme affecte aussi la composition et la quantité totale de protéines absorbées sur des NPs d'or *in vivo* (203). La quantité de protéines adsorbées sur des bâtonnets (« nanorods ») d'or est plus élevée que sur des nanosphères (204). Dolatshahi-Pirouz *et al.* ont rapporté que la topographie de la surface des NPs de platine (rugosité) a une influence significative à la fois sur la quantité des protéines absorbée sur la surface des NPs et la conformation et la fonctionnalité biologique de ces protéines (205). Ceci a aussi été démontré dans le cas de NPs de silice (206).

La chimie de surface définit le niveau d'hydrophobie de la surface. Les surfaces hydrophobes favorisent l'adsorption non spécifique de protéines (91, 190) et augmentent le risque d'élimination des NPs par le système réticulo-endothélial. Ceci démontre l'importance de l'utilisation des revêtements hydrophiles pour améliorer le temps de résidence des NPs dans la circulation sanguine (92, 93). Comme il est mentionné dans la partie 1.3.2, la composition

chimique du revêtement influence le profil d'adsorption des protéines tant aux niveaux quantitatifs qu'au niveau de la composition des protéines absorbées (95, 96). Une haute densité de greffage de PEG diminue l'adsorption des protéines et donc l'internalisation par les macrophages (190).

La charge de surface impacte les interactions de type électrostatiques des protéines avec la surface des NPs. Plusieurs études ont démontré que la charge de surface entraîne l'absorption non spécifique des protéines et augmente la clairance des NP par les macrophages (207, 208).

1.6.3 Élimination des NPs par macrophages

Les NPs sont principalement éliminées de la circulation sanguine par l'intermédiaire du système des cellules phagocytaires, macrophages et monocytes principalement, présents dans les organes comme le foie, la rate, les ganglions lymphatiques (209). Le rôle des cellules phagocytaires est d'éliminer les agents pathogènes, substances étrangères et cellules en dégénérescence. La reconnaissance des NPs comme corps étrangers par les cellules phagocytaires dépend de la reconnaissance par des récepteurs spécifiques à la surface des macrophages pour des ligands comme les protéines du complément, le fragment constant des IgG et IgM (Fc), des motifs glucidiques. Outre l'adsorption des protéines, ces mêmes propriétés physicochimiques influencent la rapidité d'élimination des NPs par les macrophages.

1.6.4 Inflammation, réponse à un corps étranger (« foreign body reaction»)

1.6.4.1 Les mécanismes généraux de réponse à un corps étranger

Les mécanismes inflammatoires en réponse à des matériaux de type polymères ont été étudiés pour les implants de PLA ou PLGA. Les cellules immunitaires peuvent reconnaître les NPs par leurs propriétés de surface et déclencher une réponse inflammatoire de façon similaire à celle déclenchée par les agents pathogènes ou les autres corps étrangers (210).

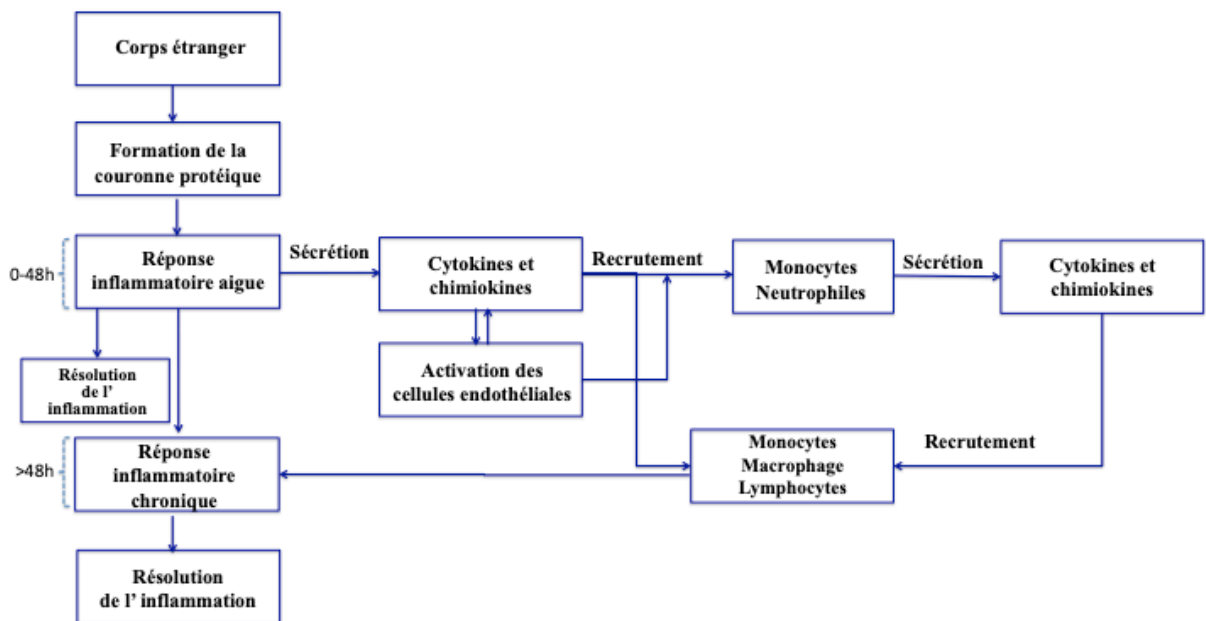


Figure 1.7 Étapes principales d'une réaction inflammatoire déclenchée par un implant polymère

En réponse à la présence d'un corps reconnu comme étranger, les cascades de signalisation sont activées, permettant la sécrétion des cytokines (ex. la famille des interleukines, $\text{TNF-}\alpha$, etc.), les chimiokines (petites molécules chimiotactiques, induisant le déplacement des cellules immunitaires, exemples: CCL1, CCL10) et l'expression des molécules d'adhésion (les sélectines E et P, ICAM-1 et VCAM-1, etc.). Ces facteurs de signalisation peuvent diriger les cellules phagocytaires vers le corps étranger, provoquent la vasodilatation et un oedème dans le tissu enflammé. Les monocytes mûrissent et se transforment en macrophages, qui libèrent des espèces réactives de l'oxygène et qui contribuent à l'élimination du corps étranger (211)

1.6.4.2 Rôle de la couronne protéique dans l'inflammation

La couronne protéique peut aussi intervenir en induisant une réponse inflammatoire. Il a été montré par Grosse *et al.* que les NPs d'oxyde de fer induisent une réponse inflammatoire via l'activation des protéines du complément dans le sang complet (212). Les travaux de Rivera *et*

al. ont démontré que la surface PEGylée des NPs de Fe₃O₄ active le système du complément dans un modèle de souris. Il a été également mis en évidence un lien entre l'activation des protéines du complément et la sécrétion des cytokines inflammatoires telles que IL-1 β , IL-6, TNF- α in vivo (159).

La réponse immunitaire innée est induite majoritairement par les cellules phagocytaires telles que macrophages, cellules dendritiques (CD), neutrophiles et mastocytes. (213). Le rôle de la couronne de protéines sur les interactions des NPs avec des cellules phagocytaires a été étudié dans le cas des macrophages (voir Section 1.6.2), mais est beaucoup moins documenté dans le cas des autres cellules phagocytaires. L'effet synergique de l'induction de la réponse immunitaire et inflammatoire entre les cellules phagocytaires et les autres types de cellules telles que les cellules épithéliales et les cellules endothéliales est rarement étudié.

Les paramètres qui peuvent impacter la composition de la couronne de protéines peuvent également influencer la réponse inflammatoire et immunitaire aux NPs (208). Ainsi, il a été montré que la taille des NPs d'or module le niveau d'expression génique des cytokines inflammatoires et leur cinétique d'expression dans les macrophages (214). Une relation non linéaire entre la taille de NPs creuses de type cœur/couronne, composées de titane recouvertes d'une couche de silice et l'expression des cytokines inflammatoires est observée. La cinétique d'expression des cytokines par les macrophages est également impactée par la taille des NPs (215). Les NPs d'argent les plus petites induisent la sécrétion de quantités plus élevées de cytokines inflammatoires dans les macrophages. À noter cependant que dans cette étude la normalisation a été effectuée en concentration massique de particules, induisant une distorsion dans les surfaces de particules en contact avec les cellules : les plus petites particules montrant une surface d'interactions plus importante que les plus grandes (216). Il a été rapporté que la forme des NPs de ZnO influence la réponse inflammatoire des cellules dendritiques CD80 et CD86 en contact avec ces NPs. Les nano-objets sous forme de plaque sécrètent significativement plus de TNF α que les NPs sphériques (217). La forme des nano-objets d'aluminium joue aussi un rôle clé sur le niveau de production d'IL-1 β dans les cellules dendritiques (218). Il a été mis en évidence que la composition chimique du revêtement de surface de Quantum Dots (QD) joue un rôle important sur l'induction de l'inflammation et

l'immunotoxicité de ces NPs (219). Également, il a été démontré dans un modèle murin que les NPs d'oxyde de fer (Fe_3O_4) lorsqu'elles possèdent un revêtement de PVP, n'induisaient ni l'activation des protéines du complément ni la sécrétion de cytokines inflammatoires. Par contre les mêmes NP modifiées par PEG activaient le système du complément et la sécrétion de certaines cytokines (159). La présence et la composition chimique du revêtement hydrophile pourrait influencer l'activation le système du complément et l'induction une réponse pro-inflammatoire.

La charge de surface peut également intervenir dans cette réponse. Les NPs lipidiques positivement chargés induisent une réponse inflammatoire par les récepteurs de type Toll (« Toll-like receptor »), tandis que les NPs neutres ou négativement chargées ne génèrent pas de réponse inflammatoire in vivo (220).

En conclusion, les études mesurant l'effet inflammatoire des NPs proviennent essentiellement du domaine de la toxicologie environnementale. Ces études se sont concentrées sur les NPs métalliques et les polluants atmosphériques. Peu études se sont intéressées aux NPs polymères dans un contexte d'utilisation biomédicale. Les données ont été majoritairement obtenues sur des cellules immunitaires. Les rares études portant sur des lignées cellulaires de type endothélium vasculaire (HUVEC, hCMEC) ont étudié les NPs métalliques. L'évaluation du potentiel proinflammatoire des particules polymères reste à faire.

1.7 Interaction avec le vivant : endocytose des NPs

L'internalisation des NPs dans les cellules endothéliales et leur éventuel transfert à travers la BHE dépendent de plusieurs mécanismes cellulaires et des propriétés physicochimiques des NPs. Ni les mécanismes de trafic intracellulaire des NPs ni les effets des propriétés physicochimiques des NPs sur l'endocytose et la transcytose ne sont pas complètement élucidés.

1.7.1 Endocytose : les mécanismes généraux

L'endocytose des NPs par les cellules peut être classifiée en deux voies: la voie de la phagocytose limitée aux cellules spécialisées du système immunitaire (macrophage, neutrophile) et les voies de la pinocytose qui concerne toutes les cellules. L'internalisation des NPs par pinocytose relève de nombreux mécanismes dont les principaux sont décrits ci-dessus.

- Endocytose médiée par *la clathrine* (EMC): Cette voie est la voie d'endocytose la mieux caractérisée. L'internalisation par l'EMC a lieu par deux mécanismes. Un mécanisme dépend d'une reconnaissance récepteur-ligand, déclenchant la formation des *clathrin-coated pits*, des vésicules se forment à la membrane plasmique et sont internalisées. Il existe également un mécanisme alternatif non spécifique qui ne dépend pas d'un récepteur (221). L'endocytose par la voie des clathrines, qu'elle dépende d'un récepteur ou non, est susceptible de diriger le matériel endocyté vers la voie lysosomale. La taille des vésicules impliquées dans l'EMC est d'environ 100 nm (222). La transferrine (Tf) est un exemple de ligand de ciblage qui peut améliorer l'internalisation via les clathrines (223).
- Endocytose par la voie cavéolaire : Les cavéoles sont de petites vésicules caractéristiques en forme de flacon, ayant une taille généralement entre 50 à 100 nm. Les vésicules à cavéoline peuvent représenter jusqu'à 10% de la surface totale des cellules endothéliales vasculaires périphériques (222) et peuvent être impliquées dans la transcytose (224). Cependant, elles sont beaucoup moins présentes sur la BHE (224). L'acide folique est un ligand de ciblage qui améliore l'internalisation par la voie cavéolaire (225).
- *La voie de la macropinocytose*: La macropinocytose est un type d'endocytose non spécifique et qui n'est pas médiée par des contacts directs entre le cargo et la membrane plasmique. La macropinocytose se fait par la formation de grandes vésicules qui sont produites par l'évagination de la membrane cellulaire. Ces vésicules sont capables de capter un grand volume de liquide extracellulaire. Ces vésicules ont une taille généralement supérieure à 1 μm (226).

- Endocytose par voie *clathrine et cavéolaire indépendante*: Cette voie est encore peu décrite au point de vue moléculaire. Cette voie implique normalement des microdomaines riches en cholestérol appelés «radeaux lipidiques», ayant un diamètre de 40 à 50 nm (227).

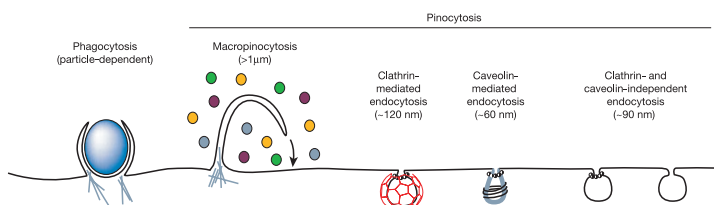


Figure 1.8 : Les principales voies d'endocytose. Figure tirée de la référence (226) .

1.7.2 Endocytose : rôle des paramètres physicochimiques des NPs

Différents paramètres physicochimiques des NPs peuvent influencer leur endocytose par les cellules non phagocytaires. L'information sur l'endocytose a généralement été obtenue sur des cellules immunitaires ou des lignées cancéreuses. L'information sur des lignées endothéliales vasculaires est beaucoup plus partielle, particulièrement pour les particules de type polymère. Néanmoins, les données accumulées sur les cellules indiquent certaines tendances.

1.7.2.1 Taille des NPs

L'endocytose des NPs de polystyrène PEGylées démontre que l'internalisation par les cellules HUVEC (cellules vasculaires endothéliales) diminue avec l'augmentation de la taille des NPs. Par contre, cette tendance est inversée si les NPs sont préincubées pendant 24 h avec le sérum avant l'essai d'endocytose (228). Ces résultats pourraient suggérer que la formation préalable d'une couronne protéique à la surface des NPs pourrait influencer le pourcentage d'endocytose des NPs PEGylées plus grandes que 100 nm. Selon les auteurs, l'augmentation des taux d'endocytose avec l'augmentation de la taille des particules pourrait être due à la différence de composition et de conformation des protéines sériques formant la couronne (228).

Chithrani *et al.* ont démontré qu'il existe une taille optimale pour obtenir un taux d'internalisation maximum des NPs d'or par les cellules HeLa. Les cellules HeLa favorisent l'internalisation des NPs de 50 nm par rapport aux NPs de 14 et 74 nm (229). Une étude similaire a démontré une internalisation optimum des NPs de silices mésoporeuses par les cellules HeLa pour des tailles de 50 nm (230). Wang *et al.* ont également démontré qu'il y a une relation linéaire entre la taille de NPs d'or et leur taux d'internalisation par les cellules HeLa et les cellules cancéreuses du poumon (231). Il a été montré que l'internalisation des NPs de latex dépend de la taille et que l'internalisation des plus petites est favorisée chez les cellules de mélanome B16. Le mécanisme d'endocytose est également déterminé par la taille des NPs. Les NPs de taille inférieure à 200 nm sont internalisées par la voie des clathrines, alors que les NPs de taille supérieure le sont plutôt par la voie cavéolaire (232). Ces résultats démontrent non seulement que le pourcentage d'endocytoses pourrait être influencé par la taille des NPs, mais aussi que les mécanismes de l'endocytoses sont taille-dépendant. Autrement dit, la taille de NPs pourrait déterminer la voie endocytoses empruntée par les NPs.

1.7.2.2 *Charge*

L'internalisation des NPs d'or cationiques fonctionnalisés par Tri méthyl-ammonium ($-N(CH_3)_3$) est beaucoup plus élevée que pour les NPs d'or fonctionnalisées par ($-PO(OH)_2$) qui possèdent des charges négatives. Ceci a été observé pour différentes lignées cellulaires y compris les cellules HUVEC (233). La surface des NPs de silice mésoporeuse a été modifiée avec la poly(éthylèneimine) (PEI) dans le but de créer une charge positive à leur surface afin de favoriser l'internalisation cellulaire et permettre la complexation d'acides nucléiques en vue de leur internalisation dans les cellules. L'internalisation des NPs positivement chargées par les cellules cancéreuses du foie (cellules HEPA-1) a été augmentée. Également l'internalisation de principe actifs et de nucléotides s'est retrouvée élevée (234).

Dausend *et al.* ont démontré que la charge de surface des NPs peut influencer les mécanismes d'internalisation des NPs. Les NPs polystyrène (PS) négativement chargées ($-60mV$) ont été synthétisées en utilisant le dodécylsulfate de sodium en tant que surfactant. Des NPs PS négativement chargées ($+60mV$) ont été synthétisées en utilisant le 2-aminoéthyl

methacrylate hydrochloride. La macropinocytose a été identifiée en tant que voie importante pour l'internalisation des NPs positivement chargées, alors que la voie des clathrines joue un rôle mineur dans l'endocytose de ces NPs. Les NPs négativement chargées s'internalisent majoritairement par une voie clathrine-indépendante encore pas très bien identifiée (235).

1.7.2.3 Chimie de surface

Comme il a été déjà mentionné, la présence de polymères hydrophiles comme le dextran, la PVP ou le PEG à la surface des NPs influence la composition de la couronne de protéines et en conséquence influencent l'endocytose des NPs (170). La longueur et la densité de PEG sont deux paramètres clés qui influencent la chimie de surface des NPs.

Densité des PEG

Walkey *et al.* ont démontré que l'internalisation des NPs d'or PEGylées (PEG 5kDa) par les macrophages diminue avec la densité de PEG jusqu'à atteindre un plateau à environ $\sim 0,5$ PEG /nm² (190). Li *et al.* ont également démontré que l'internalisation des NPs d'or PEGylées par des macrophages augmente avec la densité de PEG (236).

Zhang *et al.* ont étudié l'effet sur l'endocytose de la densité du PEG de NPs de chitosan PEGylées fonctionnalisées par le folate. - Cette étude démontre que l'internalisation des NPs par les macrophages, les cellules hépatiques et les cellules d'hépatome diminue avec la densité de PEG (237). Du *et al.* ont également démontré que l'internalisation dans les cellules cancéreuses des NPs d'or PEGylé diminue avec l'augmentation de la densité de PEG. Cependant, l'accumulation dans les tumeurs xéno greffe *in vivo* des NPs ayant une densité de surface plus élevée est plus importante (238).

Longueur des PEG

L'effet de la longueur des chaînes de PEG sur l'internalisation des NPs est beaucoup moins étudié que l'effet de la densité de surface. Pozzi *et al.* ont développé plusieurs formulations similaires de liposomes-PEGylés et positivement chargés. La longueur des chaînes de PEG greffées à la surface des liposomes varie entre 1 et 5 KDa. Le maximum d'internalisation par

les cellules cancéreuses prostatiques est observé pour des longueurs de chaînes de PEG de 2 kDa en présence de sérum. Cependant en absence de sérum, le maximum d'internalisation est obtenu avec les longueurs de chaînes de 1 et 2 kDa, alors que l'on observe une diminution de l'internalisation pour les liposomes avec PEG 5kDa (239). Ces résultats permettent de penser que la présence d'une couronne de protéines à la surface des liposomes pourrait accentuer la différence d'efficacité de l'internalisation des liposomes avec les différentes longueurs de chaînes de PEG.

Ligand de surface

Bien que cet aspect ne soit pas étudié dans ce travail de doctorat, il est important de mentionner que les ligands spécifiques à la surface des NPs peuvent jouer un rôle important dans l'endocytose. Tel que mentionné avec la description des voies principales d'endocytose, la présence de ligand spécifique peut permettre de moduler l'entrée dans la cellule.

Plusieurs types de ligands spécifiques ont été étudiés, soient des ligands naturels de récepteur présents sur la BHE (ex : insuline) ou des anticorps dirigés vers ce même récepteur (anticorps dirigés vers le récepteur de l'insuline). Les principaux exemples de ligands qui ont été étudiés pour le ciblage de la BHE sont le couple transferrine et son récepteur (240); l'apolipoprotéine E (ApoE) ligand du récepteur LDL (241); ou encore l'insuline (242).

Le type de ligand, la densité de surface, leur nombre, leur présentation sont autant de paramètres qui peuvent influencer la voie d'endocytose, l'efficacité d'endocytose ainsi que sa spécificité pour un type cellulaire (243).

Autres paramètres

Banquy *et al.* ont démontré que les propriétés mécaniques et le module de Young des NPs influencent le taux, le mécanisme et la cinétique de l'internalisation par les macrophages murins (244). La forme des NPs est un autre paramètre qui peut influencer l'efficacité d'endocytose des NPs (245). Selon Champion *et al.* la géométrie des particules pourrait influencer l'assemblage des filaments d'actine. La formation de la structure d'actine initialise l'endocytose des

particules par les cellules donc la géométrie des particules pourrait influencer l'efficacité de l'endocytoses (244). Il a aussi été démontré que l'internalisation par les cellules HeLa des NPs d'or sphériques est plus élevée que l'internalisation de la forme « bâtonnet » (229).

1.8 Interaction avec le vivant : la Transcytose

La transcytose est un transport polarisé qui au niveau de la BHE peut avoir lieu du compartiment sanguin vers le cerveau et du cerveau vers le compartiment sanguin (246). La transcytose est une voie de transport au travers des cellules qui nécessite plusieurs étapes: l'endocytose du composé ou de la NPs par invagination de la membrane cellulaire en une vésicule, le trafic vésiculaire et finalement l'exocytose. Pour permettre le transport des macromolécules (ou de NPs) sous forme intacte au travers de la cellule endothéliale, la vésicule doit contourner la voie lysosomale afin d'éviter la dégradation de son contenu. Le phénomène l'échappement de la voie lysosomale est une caractéristique de la BHE, car le transport de macromolécules s'y produit exclusivement par transcytose (247). Les mécanismes de trafic intracellulaire et les mécanismes conduisant à l'échappement de la voie lysosomale sont complexes et pas encore très bien décrits.

La voie d'endocytose empruntée par les NPs pourrait influencer leur exocytose. Les paramètres physicochimiques des NPs qui influencent le taux et le mécanisme d'endocytose peuvent donc influencer le taux de transcytose. Peu d'études se sont intéressées à étudier le rôle des paramètres physicochimiques des NPs sur la transcytose. Cependant, le peu d'études existantes sur l'influence des propriétés physicochimiques des NPs ont été réalisées sur les NPs inorganiques. Il y a manque d'études sur la transcytose des NPs polymérique en fonction de leur propriétés physicochimiques.

1.8.1 Taille des NPs

Dawson *et al.* ont démontré que le taux de transcytose des NPs de silice à travers un modèle *in vitro* de BHE (cellules hCMEC) diminue avec l'augmentation de la taille des NPs (248). Etame *et al.* ont également démontré que le taux transcytose des NPs d'or PEGylé à travers un modèle de culture conjointe de cellules endothéliales et d'astrocytes de cerveau de

rat diminue avec l'augmentation de la taille des NPs (249). La perméabilité à des QDs sur le même modèle de cellules (sans contact) diminue également avec l'augmentation de la taille des NPs (250).

1.8.2 Charge de surface

Les études effectuées sur les QDs fonctionnalisés démontrent que le taux de transcytose de QDs modifiés par des groupes aminés et positivement chargés à travers un modèle de coculture de cellules endothéliales et astrocytes de cerveau de rat est plus élevée que leurs homologues négativement chargés (carboxyle) ou neutres (PEGylés) (250). Néanmoins, l'utilisation de NPs chargées positivement pour l'administration des principes actifs au cerveau est limitée par leur toxicité (147). En effet celles-ci pourraient provoquer la perturbation de la membrane plasmique ainsi que celle des organelles, telles que les mitochondries ou les lysosomes (147).

1.8.3 Chimie de surface

La chimie de surface des NPs est un autre paramètre qui peut moduler la transcytose des NPs à travers BHE.

Densité de surface des chaînes de PEG

L'effet de la densité du PEG sur la transcytose des NPs à travers de la BHE n'a pas été étudié à notre connaissance.

Longueur des chaînes de PEG

Il a été démontré que la longueur de la chaîne du PEG influence le taux de transcytose des NPs d'or PEGylé à travers un modèle de co-culture de cellules endothéliales et astrocytes de cerveau du rat. Le taux de transcytose des NPs diminue avec l'augmentation de la longueur des chaînes du PEG. Cet effet s'est avéré plus prononcé pour les NPs plus petites que 20 nm (249).

Ligand de surface

Les ligands spécifiques peuvent influencer l'efficacité de transcytose des NPs à travers la BHE. Les types de ligands, la densité des ligands également peuvent influencer l'efficacité de la transcytose. Il a été démontré que les NPs fonctionnalisées avec une faible densité de transferrine peuvent atteindre le parenchyme cérébral chez la souris par la voie de la transcytose. Par contre, les NPs avec des densités élevées de transferrine sont fortement internalisées et ils ne peuvent pas subir la transcytose (251). Il a été également démontré que l'acide folique améliore le passage de la BHE par la voie cavéolaire (252).

Bourassa *et al.* ont démontré qu'un anticorps monoclonal qui se lie au récepteur de la transferrine, «le clone Ri7», s'internalise dans les cellules endothéliales capillaires du cerveau d'un modèle souris (253). La fonctionnalisation des NPs par le clone Ri7 pourrait être considérée pour améliorer l'administration de médicaments au cerveau. C'est dans cette optique que les Quantum dots (QD) de 10 nm ont été fonctionnalisés avec le clone Ri7. L'internalisation des QDs fonctionnalisés dans les cellules endothéliales capillaires de souris est beaucoup plus élevée que pour les QDs contrôles fonctionnalisés avec IgG non spécifique. Le clone Ri7 augmente également l'accumulation de QDs *in vivo* dans le cerveau de souris (254).

1.8.4 Autres paramètres

La forme des NPs Polystyrène influence la transcytose des NPs fonctionnalisées avec l'anticorps d'ICAM-1 et IgG. Ainsi l'équipe du Pr S. Mitragotri a démontré que les NPs en forme de bâtonnet et fonctionnalisées s'accumulent davantage dans le cerveau de souris que leurs homologues sphériques (255).

2 Hypothèse et objectifs de recherche

2.1 Justification de l'hypothèse

La conception de NPs pour l'administration de principes actifs au cerveau nécessite une bonne connaissance, d'une part des paramètres optimisant leur entrée et leur passage à travers la BHE et d'autre part, leur innocuité vis-à-vis de ces cellules.

Les limites des études actuelles, tel que montré dans cette introduction est qu'il existe peu d'études systématiques explorant les effets des paramètres physico-chimiques des NPs polymériques sur leur transcytose à travers la BHE.

Nous avons insisté dans l'introduction sur l'importance des propriétés de surface sur les propriétés biologiques des particules. Parmi les paramètres de chimie de surface nous nous sommes intéressées à la longueur des chaînes de PEG, la couronne hydrophile stabilisant la nanosuspension et permettant un certain degré de furtivité des NPs vis-à-vis de l'opsonisation et des cellules immunitaires. Tel que montré, l'effet de la longueur des chaînes de PEG sur l'endocytoses des NPs PEGylées est très peu étudié. L'importance du rôle de la longueur des chaînes de PEG a été étudiée dans une étude préclinique *in vivo* pour cribler la formulation optimale pour passer en phase 1 d'essai clinique de NPs PLA-PEG and PLGA-PEG. Dans ce contexte Hrkach *et al.* ont présenté un intervalle optimal de longueur des chaînes de PEG dans le but d'obtenir un meilleur profil pharmacocinétique et d'efficacité du traitement (78). En basant sur ces résultats précliniques, les NPs PLA-PEG avec longueur des chaînes de PEG de 5000 a été sélectionné pour l'essai clinique phase 1 (105). De plus, Lalloz *et al.* ont démontré que la longueur des chaînes de PEG de NPs PLA-PEG module l'adsorption cutanée des médicaments (256).

Tel qui a été mentionné dans le chapitre 1, la chimie de surface des NPs peut influencer les interactions des NPs avec les cellules à différents niveaux tels que internalisation, transcytose, la réponse immunitaire ou inflammatoire. Plusieurs études systématiques ont démontré que la densité de PEG peut influencer l'endocytoses dans les cellules cancéreuses ou l'accumulation dans les tumeurs xénogreffes (238), l'endocytose par les macrophages (190), la

clairance systémique des NPs (257). En suivant la même logique, il est possible de penser que la longueur des chaînes de PEG pourrait influencer l'interaction des NPs avec le vivant à d'autres niveaux.

Très peu d'études systématiques ont été effectuées sur le rôle de la longueur des chaînes de PEG sur le passage des NPs à travers les barrières cellulaires incluant la BHE. L'influence de cet effet sur l'efficacité de l'endocytose et de la transcytose des NPs polymères mérite d'être étudiée systématiquement et de façon plus approfondie.

La BHE est une barrière biologique qui maintient l'homéostasie du tissu cérébral. La perturbation des fonctions régulatrices de la perméabilité peut affecter les fonctions cérébrales (3). L'interaction des NPs avec la BHE pourrait potentiellement induire des effets indésirables. Les effets négatifs peuvent provenir des réactions toxiques, inflammatoires ou immunitaires. L'inflammation causée par les NPs a été étudiée plutôt dans le contexte de la toxicologie environnementale, mais très peu dans le contexte des NPs biomédicales. Les nano-objets qui peuvent induire une réponse inflammatoire à la BHE peuvent altérer son intégrité et perturber l'homéostasie du cerveau. Cet effet perturbateur pourrait être plus prononcé pour des applications thérapeutiques nécessitant des doses répétées. Les NPs PLA-PEG ont été largement testées pour les applications thérapeutiques, cependant il n'existe pas d'études publiées sur l'inflammation induite par ces NPs. L'influence des propriétés physicochimiques des NPs polymère sur l'induction des réponses inflammatoires est également manquante. Étant donné que la surface des NPs peut influencer l'induction d'une réponse inflammatoire, l'étude de l'influence de la longueur des chaînes de PEG sur l'induction de la réponse inflammatoire pourrait être indispensable pour concevoir des NPs avec une bonne innocuité. En effet, les NPs sont en contact direct avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins lors de l'administration i.v.. De plus, les NPs ciblant le cerveau devront traverser les cellules endothéliales de la BHE et donc pourraient potentiellement induire l'inflammation à ce niveau.

Les résultats de ces études pourraient permettre d'établir un meilleur compromis sur l'innocuité et l'efficacité de translocation afin de contribuer au design de particules ciblant le cerveau.

2.2 Hypothèse de recherche

Notre hypothèse centrale de recherche peut donc s'énoncer de cette façon :

La longueur des chaînes de Poly (éthylène glycol) attachées à la surface de nanoparticules ciblant le système nerveux central module les interactions de celles-ci avec les cellules endothéliales vasculaires.

Les sous-hypothèses suivantes seront évaluées:

La longueur des chaînes module l'efficacité d'endocytose et de transcytose à travers un modèle de barrière hématoencéphalique

La longueur des chaînes module les effets pro-inflammatoires sur les cellules vasculaires endothéliales

2.3 Objectifs de recherche et méthodologies

Afin de tester notre hypothèse de recherche, les objectifs de recherche suivants ont été déterminés.

2.3.1 Objectif 1 : Synthèse et caractérisation des nanomatériaux : les polymères et les nanoparticules

Le premier objectif consiste à préparer une bibliothèque de polymère polyester dibloc avec des tailles de PEG de 1000 à 10,000 g.mole⁻¹. La méthode de synthèse retenue est celle de la ROP utilisant le catalyseur organique DBU qui permet un bon contrôle de la réaction de polymérisation dans des conditions de température ambiante. Un polymère fluorescent sera synthétisé pour le suivi des NPs. Par la suite les polymères seront caractérisés par RMN et CPG.

L'objectif étant d'isoler l'effet de la longueur des chaînes de PEG sur les interactions biologiques, les NPs qui seront fabriquées devront avoir une taille comparable, une densité de

surface en surface (PEG/nm²) similaire. La technique de nanopréciipitation classique a été retenue pour la fabrication en ajustant les paramètres de fabrication pour obtenir des tailles similaires pour les différents lots de NPs. Pour avoir des lots de particules bien caractérisés, il faut nous assurer de l'absence de produits incomplètement purifiés. Donc, un accent particulier sera mis sur la purification des polymères et NPs pour s'assurer de l'élimination maximale de PEG non greffés. Les NPs seront caractérisées pour leur taille, potentiel zêta, leur stabilité colloïdale et la densité de PEG de surface.

2.3.2 Objectif 2 : Évaluation de l'endocytose et de la transcytose

L'objectif est d'évaluer si les propriétés de surface des NPs notamment l'effet de la longueur de la chaîne de PEG influencent significativement l'entrée dans les cellules vasculaires endothéliales. L'étude d'endocytose sera effectuée sur un modèle in vitro de cellules bEnd.3. L'étude de transcytose sera effectuée in vitro, sur un modèle de Transwell® sur lesquels une monocouche de cellules bEnd.3 est établie pour mimer la BHE. L'effet du temps sur la transcytose des NPs sera évalué. Les influences des voies d'endocytose sur l'efficacité d'internalisation et la transcytose des NPs seront étudiées.

2.3.3 Objectif 3 : Effet pro-inflammatoire des NPs sur les cellules endothéliales vasculaires

Le potentiel de l'induction de la réponse inflammatoire par les NPs PLA-PEG_x en fonction de la longueur des chaînes de PEG sera évalué sur deux modèles de cellules endothéliales bEnd.3 et HUVEC. Le potentiel de l'induction de la réponse inflammatoire sera évalué en analysant l'expression génique de 24 cytokines et chimiokines ainsi que les molécules d'adhésion. Les processus inflammatoires et la génération de ROS sont étroitement liés donc la génération des ROS par les NPs sera également évaluée.

Les objectifs 1 et 2 ont été traités dans le premier article, intitulé « Length of surface PEG modulates nanocarrier transcytosis across brain vascular endothelial cells » qui est présenté dans article 1 et le chapitre 3 de cette thèse. L'objectif 3 a été traité dans l'article intitulé « PEG length of PLA-PEG nanoparticles modulates nanoparticle interactions with endothelial cells:

effects on inflammatory responses and ROS production». Cet article est présenté dans le Chapitre 4 de cette thèse.

Bibliographie

1. Omid Y, Barar J. *Impacts of blood-brain barrier in drug delivery and targeting of brain tumors*. BioImpacts : BI. 2012;2(1):5-22.
2. Sawant RR, Torchilin VP. *Liposomes as 'smart' pharmaceutical nanocarriers*. Soft Matter. 2010;6(17):4026-44.
3. Daneman R. *The blood-brain barrier in health and disease*. Annals of neurology. 2012;72(5):648-72.
4. Correale J, Villa A. *Cellular elements of the blood-brain barrier*. Neurochemical research. 2009;34(12):2067-77.
5. Steeg PS, Camphausen KA, Smith QR. *Brain metastases as preventive and therapeutic targets*. Nature Reviews Cancer. 2011;11:352.
6. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2012;32(11):1959-72.
7. Seelig A. The role of size and charge for blood-brain barrier permeation of drugs and fatty acids. Journal of molecular neuroscience : MN. 2007;33(1):32-41.
8. Wong A, Ye M, Levy A, Rothstein J, Bergles D, Searson PC. The blood-brain barrier: an engineering perspective. Frontiers in neuroengineering. 2013;6:7.
9. Badaut J, Brunet J-F, Regli L. Aquaporins in the brain: from aqueduct to "multi-duct". Metabolic Brain Disease. 2007;22(3):251-63.
10. Devraj K, Klinger ME, Myers RL, Mokashi A, Hawkins RA, Simpson IA. GLUT-1 glucose transporters in the blood-brain barrier: differential phosphorylation. Journal of neuroscience research. 2011;89(12):1913-25.
11. Sanchez-Covarrubias L, Slosky LM, Thompson BJ, Davis TP, Ronaldson PT. Transporters at CNS barrier sites: obstacles or opportunities for drug delivery? Current pharmaceutical design. 2014;20(10):1422-49.
12. Pulgar VM. Transcytosis to Cross the Blood Brain Barrier, New Advancements and Challenges. Frontiers in Neuroscience. 2019;12(1019).
13. Arvanitis CD, Livingstone MS, Vykhodtseva N, McDannold N. *Controlled ultrasound-induced blood-brain barrier disruption using passive acoustic emissions monitoring*. PloS one. 2012;7(9):e45783.
14. Papachristodoulou A, Signorell RD, Werner B, Brambilla D, Luciani P, Cavusoglu M, et al. Chemotherapy sensitization of glioblastoma by focused ultrasound-mediated delivery of therapeutic liposomes. Journal of Controlled Release. 2019;295:130-9.
15. Mainprize T, Lipsman N, Huang Y, Meng Y, Bethune A, Ironside S, et al. Blood-Brain Barrier Opening in Primary Brain Tumors with Non-invasive MR-Guided Focused Ultrasound: A Clinical Safety and Feasibility Study. Scientific Reports. 2019;9(1):321.
16. Carpentier A, Canney M, Vignot A, Reina V, Beccaria K, Horodyckid C, et al. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. Sci Transl Med. 2016;8(343):343re2.
17. Chu C, Liu G, Janowski M, Bulte JWM, Li S, Pearl M, et al. Real-Time MRI Guidance for Reproducible Hyperosmolar Opening of the Blood-Brain Barrier in Mice. Frontiers in Neurology. 2018;9(921).

18. Fredericks W, Rapoport S. Reversible osmotic opening of the blood-brain barrier in mice. *Stroke*. 1988;19(2):266-8.
19. Rapoport SI, Thompson HK. Osmotic Opening of the Blood-Brain Barrier in the Monkey without Associated Neurological Deficits. *Science*. 1973;180(4089):971-.
20. Lundy DJ, Lee K-J, Peng IC, Hsu C-H, Lin J-H, Chen K-H, et al. *Inducing a Transient Increase in Blood-Brain Barrier Permeability for Improved Liposomal Drug Therapy of Glioblastoma Multiforme*. *ACS Nano*. 2018.
21. Jiang S, Xia R, Jiang Y, Wang L, Gao F. Vascular endothelial growth factors enhance the permeability of the mouse blood-brain barrier. *PloS one*. 2014;9(2):e86407-e.
22. Boockvar JA, Tsiouris AJ, Hofstetter CP, Kovanlikaya I, Fralin S, Kesavabhotla K, et al. Safety and maximum tolerated dose of superselective intraarterial cerebral infusion of bevacizumab after osmotic blood-brain barrier disruption for recurrent malignant glioma. *Journal of neurosurgery*. 2011;114(3):624-32.
23. Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, Hsu WH. *Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain*. *Life Sciences*. 2018;195:44-52.
24. Fleischhack G, Jaehde U, Bode U. Pharmacokinetics following intraventricular administration of chemotherapy in patients with neoplastic meningitis. *Clinical pharmacokinetics*. 2005;44(1):1-31.
25. Sudduth TL, Greenstein A, Wilcock DM. Intracranial injection of Gammagard, a human IVIg, modulates the inflammatory response of the brain and lowers A β in APP/PS1 mice along a different time course than anti-A β antibodies. *J Neurosci*. 2013;33(23):9684-92.
26. DeVos SL, Miller TM. Direct intraventricular delivery of drugs to the rodent central nervous system. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2013(75):e50326.
27. Cupaioli FA, Zucca FA, Boraschi D, Zecca L. Engineered nanoparticles. How brain friendly is this new guest? *Prog Neurobiol*. 2014;119-120:20-38.
28. Kovacs ZI, Kim S, Jikaria N, Qureshi F, Milo B, Lewis BK, et al. Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(1):E75-E84.
29. Anand BS, Dey S, Mitra AK. *Current prodrug strategies via membrane transporters/receptors*. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2002;2(6):607-20.
30. Gonçalves J, Bicker J, Gouveia F, Liberal J, Oliveira RC, Alves G, et al. Nose-to-brain delivery of levetiracetam after intranasal administration to mice. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;564:329-39.
31. Zeiadeh I, Najjar A, Karaman R. *Strategies for Enhancing the Permeation of CNS-Active Drugs through the Blood-Brain Barrier: A Review*. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2018;23(6).
32. LeWitt PA, Huff FJ, Hauser RA, Chen D, Lissin D, Zomorodi K, et al. Double-blind study of the actively transported levodopa prodrug XP21279 in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2014;29(1):75-82.
33. Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA, Allen DD. *Nanoparticle Technology for Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2002;28(1):1-13.
34. Rizvi SA, Saleh AM. *Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology*. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018;26(1):64-70.
35. Rabanel JM, Faivre J, Paka GD, Ramassamy C, Hildgen P, Banquy X. *Effect of polymer architecture on curcumin encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: Toward a drug delivery nano-platform to the CNS*. *European journal of pharmaceutics and*

biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 2015;96:409-20.

36. Masserini M. *Nanoparticles for Brain Drug Delivery* 2013.

37. Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A, Torpier G, Cecchelli R. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol.* 1997;138(4):877-89.

38. An SF, Groves M, Gray F, Scaravilli F. Early entry and widespread cellular involvement of HIV-1 DNA in brains of HIV-1 positive asymptomatic individuals. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58(11):1156-62.

39. Resnick L, Berger JR, Shapshak P, Tourtellotte WW. Early penetration of the blood-brain-barrier by HIV. *Neurology.* 1988;38(1):9-14.

40. Sardar Sinha M, Ansell-Schultz A, Civitelli L, Hildesjo C, Larsson M, Lannfelt L, et al. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathol.* 2018;136(1):41-56.

41. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2018;19:213.

42. Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, Gupta R, Plotnikova EG, He Z, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 2015;207:18-30.

43. Ahmed EM. *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review.* *Journal of advanced research.* 2015;6(2):105-21.

44. Basso J, Miranda A, Nunes S, Cova T, Sousa J, Vitorino C, et al. *Hydrogel-Based Drug Delivery Nanosystems for the Treatment of Brain Tumors.* *Gels.* 2018;4(3):62.

45. Vinogradov SV, Batrakova EV, Kabanov AV. Nanogels for Oligonucleotide Delivery to the Brain. *Bioconjugate Chemistry.* 2004;15(1):50-60.

46. Zhu J, Shi X. *Dendrimer-based nanodevices for targeted drug delivery applications.* *Journal of Materials Chemistry B.* 2013;1(34):4199-211.

47. Somani S, Dufes C. Applications of dendrimers for brain delivery and cancer therapy. *Nanomedicine (London, England).* 2014;9(15):2403-14.

48. Wu G, Barth RF, Yang W, Kawabata S, Zhang L, Green-Church K. Targeted delivery of methotrexate to epidermal growth factor receptor-positive brain tumors by means of cetuximab (IMC-C225) dendrimer bioconjugates. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(1):52-9.

49. Santos SD, Xavier M, Leite DM, Moreira DA, Custódio B, Torrado M, et al. PAMAM dendrimers: blood-brain barrier transport and neuronal uptake after focal brain ischemia. *Journal of Controlled Release.* 2018;291:65-79.

50. Lorin A, Flore C, Thomas A, Brasseur R. *Les liposomes: description, fabrication et applications.* *Biotechnologie, agronomie, société et environnement.* 2004;8(3):163-76.

51. Ostro MJ, Cullis PR. *Use of liposomes as injectable-drug delivery systems.* *American journal of hospital pharmacy.* 1989;46(8):1576-87.

52. Jain A. *Advances in Tumor Targeted Liposomes.* *Current molecular medicine.* 2018;18(1):44-57.

53. Balducci C, Mancini S, Minniti S, La Vitola P, Zotti M, Sancini G, et al. Multifunctional liposomes reduce brain β -amyloid burden and ameliorate memory impairment in Alzheimer's disease mouse models. *Journal of Neuroscience.* 2014;34(42):14022-31.

54. Xiang Y, Wu Q, Liang L, Wang X, Wang J, Zhang X, et al. Chlorotoxin-modified stealth liposomes encapsulating levodopa for the targeting delivery against Parkinson's disease in the MPTP-induced mice model. *J Drug Target.* 2012;20(1):67-75.
55. Ju RJ, Zeng F, Liu L, Mu LM, Xie HJ, Zhao Y, et al. Destruction of vasculogenic mimicry channels by targeting epirubicin plus celecoxib liposomes in treatment of brain glioma. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:1131-46.
56. Yan J, Zheng M, Zhang D. Chrysophanol liposome preconditioning protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and apoptosis in mice. *Int J Pharmacol.* 2014;10(1):55-68.
57. Barenholz Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release.* 2012;160(2):117-34.
58. Bondi ML, Di Gesù R, Craparo EF. *Chapter twelve - Lipid Nanoparticles for Drug Targeting to the Brain.* In: Düzgüneş N, editor. *Methods in Enzymology.* 508: Academic Press; 2012. p. 229-51.
59. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical research.* 2016;33(10):2373-87.
60. DiGiulio S, DiGiulio S. FDA approves onivyde combo regimen for advanced pancreatic cancer. *Oncol Times.* 2015;37(8).
61. Müller RH, Mäder K, Gohla S. *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art.* *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2000;50(1):161-77.
62. Lollo G, Vincent M, Ullio-Gamboa G, Lemaire L, Franconi F, Couez D, et al. Development of multifunctional lipid nanocapsules for the co-delivery of paclitaxel and CpG-ODN in the treatment of glioblastoma. *International Journal of Pharmaceutics.* 2015;495(2):972-80.
63. Wang JX, Sun X, Zhang ZR. Enhanced brain targeting by synthesis of 3',5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV.* 2002;54(3):285-90.
64. Kundu P, Das M, Tripathy K, Sahoo SK. Delivery of Dual Drug Loaded Lipid Based Nanoparticles across the Blood–Brain Barrier Impart Enhanced Neuroprotection in a Rotenone Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *ACS Chemical Neuroscience.* 2016;7(12):1658-70.
65. Hoy SM. Patisiran: First Global Approval. *Drugs.* 2018;78(15):1625-31.
66. Owen SC, Chan DPY, Shoichet MS. *Polymeric micelle stability.* *Nano Today.* 2012;7(1):53-65.
67. Tadros TF. *Applied surfactants: principles and applications:* John Wiley & Sons; 2006.
68. Chen H, Kim S, He W, Wang H, Low PS, Park K, et al. Fast release of lipophilic agents from circulating PEG-PDLLA micelles revealed by in vivo forster resonance energy transfer imaging. *Langmuir.* 2008;24(10):5213-7.
69. Lu J, Owen SC, Shoichet MS. Stability of Self-Assembled Polymeric Micelles in Serum. *Macromolecules.* 2011;44(15):6002-8.
70. Ren W-h, Chang J, Yan C-h, Qian X-m, Long L-x, He B, et al. Development of transferrin functionalized poly (ethylene glycol)/poly (lactic acid) amphiphilic block

copolymeric micelles as a potential delivery system targeting brain glioma. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010;21(9):2673-81.

71. Niu J, Wang A, Ke Z, Zheng Z. Glucose transporter and folic acid receptor-mediated Pluronic P105 polymeric micelles loaded with doxorubicin for brain tumor treating. *Journal of Drug Targeting*. 2014;22(8):712-23.

72. Meng X, Liu J, Yu X, Li J, Lu X, Shen T. Pluronic F127 and D- α -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate (TPGS) Mixed Micelles for Targeting Drug Delivery across The Blood Brain Barrier. *Scientific Reports*. 2017;7(1):2964.

73. Panyam J, Dali MM, Sahoo SK, Ma W, Chakravarthi SS, Amidon GL, et al. *Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly (D, L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles*. *Journal of Controlled Release*. 2003;92(1-2):173-87.

74. Riley T, Heald CR, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS, et al. *Core-Shell Structure of PLA-PEG Nanoparticles Used for Drug Delivery*. *Langmuir*. 2003;19(20):8428-35.

75. Xiao RZ, Zeng ZW, Zhou GL, Wang JJ, Li FZ, Wang AM. *Recent advances in PEG-PLA block copolymer nanoparticles*. *International journal of nanomedicine*. 2010;5:1057-65.

76. Aguilar-Castillo BA, Santos JL, Luo H, Aguirre-Chagala YE, Palacios-Hernández T, Herrera-Alonso M. *Nanoparticle stability in biologically relevant media: influence of polymer architecture*. *Soft Matter*. 2015;11(37):7296-307.

77. F.Tehrani S, Bernard-Patrzynski F, Puscas I, Leclair G, Hildgen P, Gaëlle Roullin V. *Length of surface PEG modulates nanocarrier transcytosis across brain vascular endothelial cells*2018.

78. Hrkach J, Von Hoff D, Ali MM, Andrianova E, Auer J, Campbell T, et al. *Preclinical Development and Clinical Translation of a PSMA-Targeted Docetaxel Nanoparticle with a Differentiated Pharmacological Profile*. *Science Translational Medicine*. 2012;4(128):128ra39-ra39.

79. Kwon IK, Lee SC, Han B, Park K. *Analysis on the current status of targeted drug delivery to tumors*. *Journal of Controlled Release*. 2012;164(2):108-14.

80. Chang R, Tsai W-B. Photo-induced thermal-responsive nanogels for controlled drug release. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*.

81. <https://www.entegris.com/content/en/home/resources/technical-information/particle-characterization-applications/liposomes.html>.

82. <http://lilab-tddn.pharmsci.ubc.ca/research/lipid-based-delivery-systems/solid-lipid-nanoparticle/>.

83. Mochizuki M, Hirano M, Kanmuri Y, Kudo K, Tokiwa Y. Hydrolysis of polycaprolactone fibers by lipase: effects of draw ratio on enzymatic degradation. *Journal of Applied Polymer Science*. 1995;55(2):289-96.

84. Fukuzaki H, Yoshida M, Asano M, Kumakura M. Synthesis of copoly(d,l-lactic acid) with relatively low molecular weight and in vitro degradation. *European Polymer Journal*. 1989;25(10):1019-26.

85. Xu X, Chen X, Wang Z, Jing X. Ultrafine PEG-PLA fibers loaded with both paclitaxel and doxorubicin hydrochloride and their in vitro cytotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009;72(1):18-25.

86. Gan Z, Yu D, Zhong Z, Liang Q, Jing X. Enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone)/poly (DL-lactide) blends in phosphate buffer solution. *Polymer*. 1999;40(10):2859-62.

87. Yamashita K, Kikkawa Y, Kurokawa K, Doi Y. Enzymatic Degradation of Poly(l-lactide) Film by Proteinase K: Quartz Crystal Microbalance and Atomic Force Microscopy Study. *Biomacromolecules*. 2005;6(2):850-7.
88. Zeng J, Chen X, Liang Q, Xu X, Jing X. Enzymatic Degradation of Poly(L-lactide) and Poly(ϵ -caprolactone) Electrospun Fibers. *Macromolecular Bioscience*. 2004;4(12):1118-25.
89. Marin E, Briceño MI, Caballero-George C. *Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs*. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:3071-90.
90. Makadia HK, Siegel SJ. *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier*. *Polymers*. 2011;3(3):1377-97.
91. Nie S. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine*. 2010;5(4):523-8.
92. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. *PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications*. *Journal of controlled release*. 2012;161(2):505-22.
93. Semete B, Booysen L, Kalombo L, Ramalapa B, Hayeshi R, Swai HS. *Effects of protein binding on the biodistribution of PEGylated PLGA nanoparticles post oral administration*. *International journal of pharmaceutics*. 2012;424(1-2):115-20.
94. Blanco E, Shen H, Ferrari M. *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*. *Nature biotechnology*. 2015;33(9):941-51.
95. Salmaso S, Caliceti P. *Stealth properties to improve therapeutic efficacy of drug nanocarriers*. *Journal of drug delivery*. 2013;2013.
96. Gaucher G, Asahina K, Wang J, Leroux J-C. *Effect of Poly(N-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(d,l-lactide) as Coating Agent on the Opsonization, Phagocytosis, and Pharmacokinetics of Biodegradable Nanoparticles*. *Biomacromolecules*. 2009;10(2):408-16.
97. Gref R, Domb A, Quellec P, Blunk T, Müller RH, Verbavatz JM, et al. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv Drug Deliv Rev*. 1995;16(2-3):215-33.
98. Alconcel SNS, Baas AS, Maynard HD. FDA-approved poly(ethylene glycol)-protein conjugate drugs. *Polymer Chemistry*. 2011;2(7):1442-8.
99. Papi M, Caputo D, Palmieri V, Coppola R, Palchetti S, Bugli F, et al. Clinically approved PEGylated nanoparticles are covered by a protein corona that boosts the uptake by cancer cells. *Nanoscale*. 2017;9(29):10327-34.
100. Owens III DE, Peppas NA. *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*. *International journal of pharmaceutics*. 2006;307(1):93-102.
101. Riley T, Stolnik S, Heald CR, Xiong CD, Garnett MC, Illum L, et al. Physicochemical Evaluation of Nanoparticles Assembled from Poly(lactic acid)-Poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) Block Copolymers as Drug Delivery Vehicles. *Langmuir*. 2001;17(11):3168-74.
102. Rabanel J-M, Faivre J, Tehrani SF, Lalloz A, Hildgen P, Banquy X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7(19):10374-85.
103. ClinicalTrials.gov. A Phase 2 Study to Determine the Safety and Efficacy of BIND-014 (Docetaxel Nanoparticles for Injectable Suspension), Administered to Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01812746.
104. ClinicalTrials.gov. A Phase 2 Study to Determine the Safety and Efficacy of BIND-014 (Docetaxel Nanoparticles for Injectable Suspension) as Second-line Therapy to Patients With Non-Small Cell Lung Cancer. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01792479.

105. ClinicalTrials.gov. A Study of BIND-014 Given to Patients With Advanced or Metastatic Cancer.ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01300533.
106. ClinicalTrials.gov. A Study of BIND-014 (Docetaxel Nanoparticles for Injectable Suspension) as Second-line Therapy for Patients With KRAS Positive or Squamous Cell Non-Small Cell Lung Cancer.NCT02283320.
107. ClinicalTrials.gov. A Study of BIND-014 in Patients With Urothelial Carcinoma, Cholangiocarcinoma, Cervical Cancer and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (iNSITE2).NCT02479178.
108. He H, Liu L, Morin EE, Liu M, Schwendeman A. Survey of Clinical Translation of Cancer Nanomedicines—Lessons Learned from Successes and Failures. *Accounts of Chemical Research*. 2019.
109. Neises B, Steglich W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie, International Edition in English*. 1978;17(7):522-4.
110. Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, et al. Formulation of functionalized PLGA–PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*. 2007;28(5):869-76.
111. Marrache S, Dhar S. Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(40):16288-93.
112. Qian H, Wohl AR, Crow JT, Macosko CW, Hoyer TR. A Strategy for Control of “Random” Copolymerization of Lactide and Glycolide: Application to Synthesis of PEG-b-PLGA Block Polymers Having Narrow Dispersity. *Macromolecules*. 2011;44(18):7132-40.
113. Gilbert RG, Hess M, Jenkins AD, Jones RG, Kratochvíl P, Stepto RFT. Dispersity in Polymer Science. *Pure Appl Chem*. 2009;8(2):351-3.
114. Albertsson AC, Srivastava RK. Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(9):1077-93.
115. Lohmeijer BGG, Pratt RC, Leibfarth F, Logan JW, Long DA, Dove AP, et al. Guanidine and Amidine Organocatalysts for Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters. *Macromolecules*. 2006;39(25):8574-83.
116. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods critical comparison. *Advances in colloid and interface science*. 2011;163(2):90-122.
117. Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R6), (2016).
118. Grabowski N, Hillaireau H, Vergnaud J, Tsapis N, Pallardy M, Kerdine-Romer S, et al. Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages. *Int J Pharm*. 2015;482(1-2):75-83.
119. Letchford K, Burt H. *A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes*. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2007;65(3):259-69.
120. Galindo-Rodriguez S, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical research*. 2004;21(8):1428-39.
121. Rode García T, García Ac A, Lalloz A, Lacasse F-X, Hildgen P, Rabanel J-M, et al. Unified Scaling of the Structure and Loading of Nanoparticles Formed by Diffusion-Limited Coalescence. *Langmuir*. 2018;34(20):5772-80.

122. Rode Garcia T, Garcia Ac A, Lalloz A, Lacasse FX, Hildgen P, Rabanel JM, et al. Unified Scaling of the Structure and Loading of Nanoparticles Formed by Diffusion-Limited Coalescence. *Langmuir*. 2018;34(20):5772-80.
123. Pustulka KM, Wohl AR, Lee HS, Michel AR, Han J, Hoyer TR, et al. Flash Nanoprecipitation: Particle Structure and Stability. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(11):4367-77.
124. Karnik R, Gu F, Basto P, Cannizzaro C, Dean L, Kyei-Manu W, et al. Microfluidic Platform for Controlled Synthesis of Polymeric Nanoparticles. *Nano Letters*. 2008;8(9):2906-12.
125. Asadi H, Rostamizadeh K, Salari D, Hamidi M. Preparation of biodegradable nanoparticles of tri-block PLA-PEG-PLA copolymer and determination of factors controlling the particle size using artificial neural network. *Journal of microencapsulation*. 2011;28(5):406-16.
126. Lince F, Marchisio DL, Barresi AA. Strategies to control the particle size distribution of poly-ε-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of colloid and interface science*. 2008;322(2):505-15.
127. Legrand P, Lesieur S, Bochot A, Gref R, Raatjes W, Barratt G, et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;344(1):33-43.
128. Berchane NS, Carson KH, Rice-Ficht AC, Andrews MJ. Effect of mean diameter and polydispersity of PLG microspheres on drug release: experiment and theory. *International journal of pharmaceutics*. 2007;337(1-2):118-26.
129. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 2010;31(13):3657-66.
130. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*. 2009;86(3):215-23.
131. Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of nanobiotechnology*. 2014;12:5-.
132. Fang J, Nakamura H, Maeda H. *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011;63(3):136-51.
133. Maeda H, Matsumura Y. EPR effect based drug design and clinical outlook for enhanced cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(3):129-30.
134. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008;5(4):505-15.
135. Pecora R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research*. 2000;2(2):123-31.
136. Mainard M, Jacob D. Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. *Photoniques*. 2016(83):40-4.
137. Gross J, Sayle S, Karow AR, Bakowsky U, Garidel P. Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;104:30-41.
138. Ramli RA, Laftah WA, Hashim S. Core-shell polymers: a review. *RSC Advances*. 2013;3(36):15543-65.

139. Christine V, Ponchel G. Polymer nanoparticles for nanomedicines. A guide for their design. *Anticancer Res.* 2017;37:1544.
140. Bootz A, Vogel V, Schubert D, Kreuter J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV.* 2004;57(2):369-75.
141. Djiokeng Paka G, Doggui S, Zaghmi A, Safar R, Dao L, Reisch A, et al. Neuronal Uptake and Neuroprotective Properties of Curcumin-Loaded Nanoparticles on SK-N-SH Cell Line: Role of Poly(lactide-co-glycolide) Polymeric Matrix Composition. *Molecular Pharmaceutics.* 2016;13(2):391-403.
142. Rice SB, Chan C, Brown SC, Eschbach P, Han L, Ensor DS, et al. Particle size distributions by transmission electron microscopy: an interlaboratory comparison case study. *Metrologia.* 2013;50(6):663-78.
143. Bonevich J, Haller W. NIST—NCL Joint Assay Protocol, PCC-7: Measuring the size of nanoparticles using transmission electron microscopy (TEM). Gaithersburg, MD: National Institute of Standards and Technology. 2010.
144. Rabanel J-M, Adibnia V, Tehrani SF, Sanche S, Hildgen P, Banquy X, et al. Nanoparticle heterogeneity: an emerging structural parameter influencing particle fate in biological media? *Nanoscale.* 2019;11(2):383-406.
145. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2008;69(1):1-9.
146. Jiang J, Oberdörster G, Biswas P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research.* 2009;11(1):77-89.
147. Frohlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:5577-91.
148. Schaeublin NM, Braydich-Stolle LK, Schrand AM, Miller JM, Hutchison J, Schlager JJ, et al. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale.* 2011;3(2):410-20.
149. Bhattacharjee S, de Haan LH, Evers NM, Jiang X, Marcelis AT, Zuilhof H, et al. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7:25.
150. Platel A, Carpentier R, Becart E, Mordacq G, Betbeder D, Nessler F. Influence of the surface charge of PLGA nanoparticles on their in vitro genotoxicity, cytotoxicity, ROS production and endocytosis. *Journal of applied toxicology : JAT.* 2016;36(3):434-44.
151. Dobrovolskaia MA, Clogston JD, Neun BW, Hall JB, Patri AK, McNeil SE. Method for Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties in Vitro. *Nano Lett.* 2008;8(8):2180-7.
152. Thorek DLJ, Tsourkas A. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials.* 2008;29(26):3583-90.
153. Yue Z-G, Wei W, Lv P-P, Yue H, Wang L-Y, Su Z-G, et al. Surface Charge Affects Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Chitosan-Based Nanoparticles. *Biomacromolecules.* 2011;12(7):2440-6.
154. Zhao J, Stenzel MH. Entry of nanoparticles into cells: the importance of nanoparticle properties. *Polymer Chemistry.* 2018;9(3):259-72.

155. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 2016;235:337-51.
156. Rabanel J-M, Hildgen P, Banquy X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *Journal of Controlled Release*. 2014;185:71-87.
157. Gref R, Luck M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2000;18(3-4):301-13.
158. Meng F, Engbers GH, Feijen J. Polyethylene glycol-grafted polystyrene particles. *J Biomed Mater Res A*. 2004;70(1):49-58.
159. Escamilla-Rivera V, Solorio-Rodriguez A, Uribe-Ramirez M, Lozano O, Lucas S, Chagolla-Lopez A, et al. Plasma protein adsorption on Fe₃O₄-PEG nanoparticles activates the complement system and induces an inflammatory response. *INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE*. 2019;14:2055-67.
160. Grenier P, de Oliveira Viana IM, Lima EM, Bertrand N. Anti-polyethylene glycol antibodies alter the protein corona deposited on nanoparticles and the physiological pathways regulating their fate in vivo. *Journal of controlled release*. 2018;287:121-31.
161. Bamberger D, Hobernik D, Konhäuser M, Bros M, Wich PR. Surface Modification of Polysaccharide-Based Nanoparticles with PEG and Dextran and the Effects on Immune Cell Binding and Stimulatory Characteristics. *Molecular Pharmaceutics*. 2017;14(12):4403-16.
162. Huang Y, Su BN, Ye Q, Palaniswamy VA, Bolgar MS, Raglione TV. Improving the efficiency of quantitative (1)H NMR: an innovative external standard-internal reference approach. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;88:1-6.
163. Mao Y, Thompson MJ, Wang Q, Tsai EW. Quantitation of poloxamers in pharmaceutical formulations using size exclusion chromatography and colorimetric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004;35(5):1127-42.
164. Umbach E. Practical surface analysis: Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy, (Practical Surface Analysis, Vol. 1), edited by D. Briggs and MP Seah, Wiley, Chichester, 1991, £ 85.00, ISBN 0-471-920819. Elsevier; 1992.
165. Briggs D, Grant J. Surface analysis by Auger and x-ray photoelectron spectroscopy. 2003, Chichester. West Sussex, UK: IM Publications. xi.
166. Brindley A, Davis S, Davies M, Watts J. Polystyrene colloids with surface-grafted polyethylene oxide as model systems for site-specific drug delivery: I. Preparation and surface chemical characterization using SIMS and XPS. *Journal of colloid and interface science*. 1995;171(1):150-61.
167. Banquy X, Leclair G, Rabanel J-M, Argaw A, Bouchard J-F, Hildgen P, et al. Selectins Ligand Decorated Drug Carriers for Activated Endothelial Cell Targeting. *Bioconjugate Chemistry*. 2008;19(10):2030-9.
168. Moore TL, Rodriguez-Lorenzo L, Hirsch V, Balog S, Urban D, Jud C, et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(17):6287-305.
169. Naito M, Hosokawa M, Yokoyama T, Nogi K. Nanoparticle Technology Handbook: Elsevier Science; 2007.
170. Gref R, Lück M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the

- corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2000;18(3–4):301-13.
171. Ayala V, Herrera AP, Latorre-Esteves M, Torres-Lugo M, Rinaldi C. Effect of surface charge on the colloidal stability and in vitro uptake of carboxymethyl dextran-coated iron oxide nanoparticles. *Journal of nanoparticle research : an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology*. 2013;15(8):1874-.
 172. Santander-Ortega MJ, Jodar-Reyes AB, Csaba N, Bastos-Gonzalez D, Ortega-Vinuesa JL. Colloidal stability of pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: a variety of stabilisation mechanisms. *J Colloid Interface Sci*. 2006;302(2):522-9.
 173. F.Tehrani S, Bernard-Patrzynski F, Puscas I, Leclair G, Hildgen P, Roullin VG. Length of surface PEG modulates nanocarrier transcytosis across brain vascular endothelial cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2019;16:185-94.
 174. Hartmann R, Weidenbach M, Neubauer M, Fery A, Parak WJ. Stiffness-Dependent In Vitro Uptake and Lysosomal Acidification of Colloidal Particles. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 2015;54(4):1365-8.
 175. Hartmann R, Weidenbach M, Neubauer M, Fery A, Parak WJ. Stiffness-dependent in vitro uptake and lysosomal acidification of colloidal particles. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015;54(4):1365-8.
 176. Trewyn BG, Nieweg JA, Zhao Y, Lin VSY. Biocompatible mesoporous silica nanoparticles with different morphologies for animal cell membrane penetration. *Chemical Engineering Journal*. 2008;137(1):23-9.
 177. Sant S, Poulin S, Hildgen P. Effect of polymer architecture on surface properties, plasma protein adsorption, and cellular interactions of pegylated nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008;87A(4):885-95.
 178. Grabarek AD, Weinbuch D, Jiskoot W, Hawe A. Critical Evaluation of Microfluidic Resistive Pulse Sensing for Quantification and Sizing of Nanometer- and Micrometer-Sized Particles in Biopharmaceutical Products. *J Pharm Sci*. 2019;108(1):563-73.
 179. Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*. 2009;8(7):543-57.
 180. Caracciolo G, Farokhzad OC, Mahmoudi M. Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona. *Trends Biotechnol*. 2017;35(3):257-64.
 181. Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*. 2012;7:779.
 182. Vu VP, Gifford GB, Chen F, Benasutti H, Wang G, Groman EV, et al. Immunoglobulin deposition on biomolecule corona determines complement opsonization efficiency of preclinical and clinical nanoparticles. *Nature Nanotechnology*. 2019;14(3):260-8.
 183. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(6):428-37.
 184. Chen F, Wang G, Griffin JI, Brenneman B, Banda NK, Holers VM, et al. Complement proteins bind to nanoparticle protein corona and undergo dynamic exchange in vivo. *Nature nanotechnology*. 2017;12(4):387.
 185. Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, et al. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(26):16969-74.

186. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*. 2010;11(9):785-97.
187. Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaebler WJ, Keeble AH. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology*. 2010;215(1):1-11.
188. Moghimi SM, Wibroe PP, Wu L, Farhangrazi ZS. Insidious pathogen-mimicking properties of nanoparticles in triggering the lectin pathway of the complement system. *European Journal of Nanomedicine*. 2015;7(3):263-8.
189. Moghimi SM, Andersen AJ, Hashemi SH, Lettieri B, Ahmadvand D, Hunter AC, et al. Complement activation cascade triggered by PEG–PL engineered nanomedicines and carbon nanotubes: The challenges ahead. *Journal of Controlled Release*. 2010;146(2):175-81.
190. Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(4):2139-47.
191. Bertrand N, Grenier P, Mahmoudi M, Lima EM, Appel EA, Dormont F, et al. Mechanistic understanding of in vivo protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics. *Nat Commun*. 2017;8(1):777.
192. Palchetti S, Pozzi D, Mahmoudi M, Caracciolo G. Exploitation of nanoparticle–protein corona for emerging therapeutic and diagnostic applications. *Journal of Materials Chemistry B*. 2016;4(25):4376-81.
193. Schöttler S, Becker G, Winzen S, Steinbach T, Mohr K, Landfester K, et al. Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers. *Nature Nanotechnology*. 2016;11:372.
194. Aoyama M, Hata K, Higashisaka K, Nagano K, Yoshioka Y, Tsutsumi Y. Clusterin in the protein corona plays a key role in the stealth effect of nanoparticles against phagocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;480(4):690-5.
195. Dal Magro R, Albertini B, Beretta S, Rigolio R, Donzelli E, Chiorazzi A, et al. Artificial apolipoprotein corona enables nanoparticle brain targeting. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2018;14(2):429-38.
196. Kim HR, Andrieux K, Gil S, Taverna M, Chacun H, Desmaele D, et al. Translocation of poly(ethylene glycol-co-hexadecyl)cyanoacrylate nanoparticles into rat brain endothelial cells: role of apolipoproteins in receptor-mediated endocytosis. *Biomacromolecules*. 2007;8(3):793-9.
197. Röcker C, Pötzl M, Zhang F, Parak WJ, Nienhaus GU. A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nature nanotechnology*. 2009;4(9):577.
198. Lee YK, Choi E-J, Webster TJ, Kim S-H, Khang D. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *International journal of nanomedicine*. 2014;10:97-113.
199. Gunawan C, Lim M, Marquis CP, Amal R. Nanoparticle–protein corona complexes govern the biological fates and functions of nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014;2(15):2060-83.
200. Shannahan JH, Lai X, Ke PC, Podila R, Brown JM, Witzmann FA. Silver nanoparticle protein corona composition in cell culture media. *PloS one*. 2013;8(9):e74001.

201. Harashima H, Sakata K, Funato K, Kiwada H. Enhanced Hepatic Uptake of Liposomes Through Complement Activation Depending on the Size of Liposomes. *Pharmaceutical research*. 1994;11(3):402-6.
202. Devine DV, Wong K, Serrano K, Chonn A, Cullis PR. Liposome—complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1994;1191(1):43-51.
203. Garcia-Alvarez R, Hadjidemetriou M, Sanchez-Iglesias A, Liz-Marzan LM, Kostarelos K. In vivo formation of protein corona on gold nanoparticles. The effect of their size and shape. *Nanoscale*. 2018;10(3):1256-64.
204. Gagner JE, Lopez MD, Dordick JS, Siegel RW. Effect of gold nanoparticle morphology on adsorbed protein structure and function. *Biomaterials*. 2011;32(29):7241-52.
205. Dolatshahi-Pirouz A, Rechendorff K, Hovgaard MB, Foss M, Chevallier J, Besenbacher F. Bovine serum albumin adsorption on nano-rough platinum surfaces studied by QCM-D. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008;66(1):53-9.
206. Paula AJ, Silveira CP, Martinez DST, Souza Filho AG, Romero FV, Fonseca LC, et al. Topography-driven bionano-interactions on colloidal silica nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2014;6(5):3437-47.
207. Forest V, Cottier M, Pourchez J. Electrostatic interactions favor the binding of positive nanoparticles on cells: A reductive theory. *Nano Today*. 2015;10(6):677-80.
208. Corbo C, Molinaro R, Parodi A, Toledano Furman NE, Salvatore F, Tasciotti E. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nanomedicine (London, England)*. 2016;11(1):81-100.
209. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano today*. 2015;10(4):487-510.
210. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*. 2007;2:469.
211. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*. 2008;20(2):86-100.
212. Wolf-Grosse S, Rokstad AM, Ali S, Lambris JD, Mollnes TE, Nilsen AM, et al. Iron oxide nanoparticles induce cytokine secretion in a complement-dependent manner in a human whole blood model. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:3927-40.
213. Jiao Q, Li L, Mu Q, Zhang Q. Immunomodulation of nanoparticles in nanomedicine applications. *BioMed research international*. 2014;2014.
214. Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. 2009;5(13):1553-61.
215. Oh WK, Kim S, Choi M, Kim C, Jeong YS, Cho BR, et al. Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. *ACS Nano*. 2010;4(9):5301-13.
216. Park MV, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJ, Verharen HW, Briede JJ, et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(36):9810-7.
217. Heng BC, Zhao X, Tan EC, Khamis N, Assodani A, Xiong S, et al. Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles. *Archives of toxicology*. 2011;85(12):1517-28.

218. Sun B, Ji Z, Liao Y-P, Wang M, Wang X, Dong J, et al. Engineering an Effective Immune Adjuvant by Designed Control of Shape and Crystallinity of Aluminum Oxyhydroxide Nanoparticles. *ACS Nano*. 2013;7(12):10834-49.
219. Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Surface Coatings Determine Cytotoxicity and Irritation Potential of Quantum Dot Nanoparticles in Epidermal Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(1):143-53.
220. Kedmi R, Ben-Arie N, Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials*. 2010;31(26):6867-75.
221. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66(17):2873-96.
222. Pearse BM, Robinson MS. Clathrin, adaptors, and sorting. *Annual review of cell biology*. 1990;6(1):151-71.
223. Mayle KM, Le AM, Kamei DT. The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1820(3):264-81.
224. Brown RC, Morris AP, O'Neil RG. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res*. 2007;1130(1):17-30.
225. Wang Z, Tiruppathi C, Cho J, Minshall RD, Malik AB. Delivery of nanoparticle-complexed drugs across the vascular endothelial barrier via caveolae. *IUBMB Life*. 2011;63(8):659-67.
226. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003;422:37.
227. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(8):603-12.
228. Ho YT, Kamm RD, Kah JCY. Influence of protein corona and caveolae-mediated endocytosis on nanoparticle uptake and transcytosis. *Nanoscale*. 2018;10(26):12386-97.
229. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters*. 2006;6(4):662-8.
230. Lu F, Wu S-H, Hung Y, Mou C-Y. Size Effect on Cell Uptake in Well-Suspended, Uniform Mesoporous Silica Nanoparticles. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. 2009;5(12):1408-13.
231. Wang S-H, Lee C-W, Chiou A, Wei P-K. Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *Journal of nanobiotechnology*. 2010;8:33-.
232. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *The Biochemical journal*. 2004;377(Pt 1):159-69.
233. Hühn D, Kantner K, Geidel C, Brandholt S, De Cock I, Soenen SJ, et al. Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: focusing on the sign of the net charge. *ACS nano*. 2013;7(4):3253-63.
234. Xia T, Kovochich M, Liong M, Meng H, Kabehie S, George S, et al. Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs. *ACS Nano*. 2009;3(10):3273-86.
235. Dausend J, Musyanovych A, Dass M, Walther P, Schrezenmeier H, Landfester K, et al. Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells. *Macromol Biosci*. 2008;8(12):1135-43.

236. Li Y, Kröger M, Liu WK. Endocytosis of PEGylated nanoparticles accompanied by structural and free energy changes of the grafted polyethylene glycol. *Biomaterials*. 2014;35(30):8467-78.
237. Zhang S, Tang C, Yin C. Effects of poly(ethylene glycol) grafting density on the tumor targeting efficacy of nanoparticles with ligand modification. *Drug Deliv*. 2015;22(2):182-90.
238. Du XJ, Wang JL, Liu WW, Yang JX, Sun CY, Sun R, et al. Regulating the surface poly(ethylene glycol) density of polymeric nanoparticles and evaluating its role in drug delivery in vivo. *Biomaterials*. 2015;69:1-11.
239. Pozzi D, Colapicchioni V, Caracciolo G, Piovesana S, Capriotti AL, Palchetti S, et al. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio-nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells. *Nanoscale*. 2014;6(5):2782-92.
240. Lam FC, Morton SW, Wyckoff J, Vu Han T-L, Hwang MK, Maffa A, et al. Enhanced efficacy of combined temozolomide and bromodomain inhibitor therapy for gliomas using targeted nanoparticles. *Nature Communications*. 2018;9(1):1991.
241. Kim HR, Andrieux K, Gil S, Taverna M, Chacun H, Desmaële D, et al. Translocation of Poly(ethylene glycol-co-hexadecyl)cyanoacrylate Nanoparticles into Rat Brain Endothelial Cells: Role of Apolipoproteins in Receptor-Mediated Endocytosis. *Biomacromolecules*. 2007;8(3):793-9.
242. Shilo M, Motiei M, Hana P, Popovtzer R. Transport of nanoparticles through the blood–brain barrier for imaging and therapeutic applications. *Nanoscale*. 2014;6(4):2146-52.
243. Wang D, Lin Z, Wang T, Yao Z, Qin M, Zheng S, et al. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both? *Journal of Hazardous Materials*. 2016;308:328-34.
244. Banquy X, Suarez F, Argaw A, Rabanel J-M, Grutter P, Bouchard J-F, et al. Effect of mechanical properties of hydrogel nanoparticles on macrophage cell uptake. *Soft Matter*. 2009;5(20):3984-91.
245. Champion JA, Katare YK, Mitragotri S. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of Controlled Release*. 2007;121(1-2):3-9.
246. Fullstone G, Nyberg S, Tian X, Battaglia G. From the Blood to the Central Nervous System: A Nanoparticle's Journey Through the Blood-Brain Barrier by Transcytosis. *International review of neurobiology*. 2016;130:41-72.
247. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*. 2010;37(1):13-25.
248. Ye D, Raghnaill MN, Bramini M, Mahon E, Åberg C, Salvati A, et al. Nanoparticle accumulation and transcytosis in brain endothelial cell layers. *Nanoscale*. 2013;5(22):11153-65.
249. Etame AB, Smith CA, Chan WCW, Rutka JT. Design and potential application of PEGylated gold nanoparticles with size-dependent permeation through brain microvasculature. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011;7(6):992-1000.
250. Hanada S, Fujioka K, Inoue Y, Kanaya F, Manome Y, Yamamoto K. Cell-based in vitro blood-brain barrier model can rapidly evaluate nanoparticles' brain permeability in association with particle size and surface modification. *Int J Mol Sci*. 2014;15(2):1812-25.
251. Wiley DT, Webster P, Gale A, Davis ME. Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(21):8662-7.

252. Agrawal U, Chashoo G, Sharma PR, Kumar A, Saxena AK, Vyas SP. Tailored polymer-lipid hybrid nanoparticles for the delivery of drug conjugate: dual strategy for brain targeting. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;126:414-25.
253. Bourassa P, Alata W, Tremblay C, Paris-Robidas S, Calon F. Transferrin Receptor-Mediated Uptake at the Blood–Brain Barrier Is Not Impaired by Alzheimer’s Disease Neuropathology. *Molecular Pharmaceutics*. 2019;16(2):583-94.
254. Paris-Robidas S, Brouard D, Emond V, Parent M, Calon F. Internalization of targeted quantum dots by brain capillary endothelial cells in vivo. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016;36(4):731-42.
255. Kolhar P, Anselmo AC, Gupta V, Pant K, Prabhakar Pandian B, Ruoslahti E, et al. Using shape effects to target antibody-coated nanoparticles to lung and brain endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(26):10753-8.
256. Lalloz A, Bolzinger M-A, Briançon S, Faivre J, Rabanel J-M, Garcia Ac A, et al. Subtle and unexpected role of PEG in tuning the penetration mechanisms of PLA-based nanoformulations into intact and impaired skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;563:79-90.
257. Bertrand N, Grenier P, Mahmoudi M, Lima EM, Appel EA, Dormont F, et al. Mechanistic understanding of in vivo protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics. *Nature communications*. 2017;8(1):777.

3 Article 1 “Length of surface PEG modulates nanocarrier transcytosis across brain vascular endothelial cells”

Soudeh F. Tehrani, Florian Bernard-Patrzynski, Ina Puscas, Grégoire Leclair, Patrice Hildgen,
V Gaëlle Roullin*

Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montreal,
Québec H3C 3J7, Canada

Publié dans Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine (2019) 16, 185-194.

Article 1 : Résumé

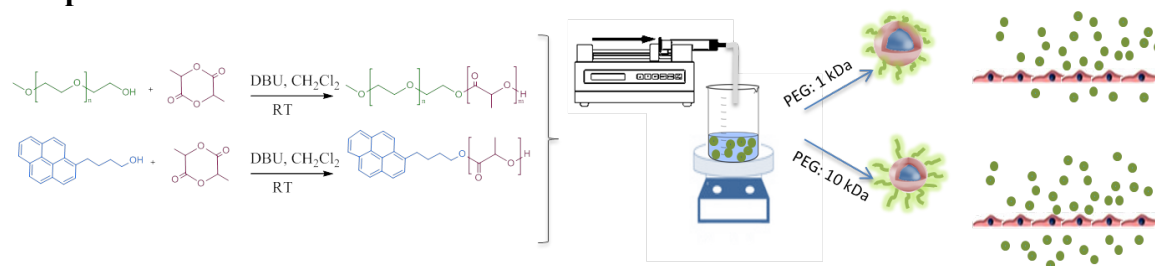
Une bibliothèque des polymères diblocs PLA-PEG a été développée pour étudier le rôle de la longueur des chaînes de PEG sur leur transcytose à travers les cellules endothéliales vasculaires cérébrales. Les NPs de 100 nm avec différentes longueurs de chaînes de PEG à leur surface et marquées avec une sonde fluorescente (pyrène butanol) ont été utilisés pour étudier les phénomènes d'endocytose et de transcytose sur monocouches de cellules endothéliales vasculaires de souris.

Les mécanismes de transport des NPs ont été évalués en utilisant différents inhibiteurs de l'endocytose. Nos résultats révèlent qu'il existe une corrélation entre la longueur des chaînes de PEG et la translocation des nanoparticules.

Les taux de transcytose les plus élevés ont été observés pour les NPs de PLA-PEG₅₀₀₀ et de PLA-PEG₁₀₀₀₀. Les résultats de l'étude mécanistique démontrent que la voie macropinocytose semble jouer un rôle central dans l'endocytose des NPs.

Cette étude constitue la première étude systématique explorant le rôle de la longueur de la chaîne PEG sur l'endocytose et la transcytose de nanoparticules dans un modèle *in vitro* de la barrière hématoencéphalique.

Graphical abstract



Standardized 100-nm PLA-PEG nanoparticles were synthesized in order to study the influence of PEG length on brain endothelial cell endocytosis and transcytosis. Results showed that longer PEG chains promoted a higher transcytosis efficiency, mainly through macropinocytosis mechanisms.

3.1 Abstract.

Diblock PLA-PEG nanoparticles were produced to establish the role of PEG chain length on brain vascular endothelial cell transcytosis. 100-nm nanoparticles tagged with fluorescent pyrene butanol and coated with PEG chains (Mw: 1 - 10 kDa) , at similar PEG surface density, were used to study endocytosis and transcytosis phenomena on mouse vascular endothelial cell monolayers. The transport mechanisms were then investigated through inhibitory processes. Our results show that there is an evident correlation between PEG chain length and nanoparticle translocation. The highest transcytosis rates were obtained with PEG₅₀₀₀ and PEG₁₀₀₀₀ and macropinocytosis appeared to play a central role in cell uptake. This study constitutes the first systematic exploration of the role of PEG chain length on nanoparticle endocytosis and transcytosis in an *in vitro* model of the blood-brain barrier.

Keywords: PLA-PEG nanoparticles; PEG length; endocytosis; transcytosis; mechanisms; colloidal stability.

Abbreviations

PLA: poly(D,L-lactide), PEG: poly(ethylene glycol); NPs: nanoparticles; CME: clathrin-mediated endocytosis; CIE: clathrin-independent endocytosis; BBB: blood-brain barrier; CNS: central nervous system; GEN: genistein; PS2: PitStop 2; EIPA: 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride.

3.2 Background

The Blood-Brain Barrier (BBB) is a critical interface of the human body acting as a physical and metabolic barrier between the brain and the peripheral circulation. This complex structure, made of endothelial cells interconnected by tight junctions, is surrounded by pericytes and astrocyte endfeet. The BBB results in a protective, quasi-impermeable obstacle for most therapeutic molecules (1). Presently, less than 5% of commercially available drugs can reach the brain parenchyma, mostly in a very limited manner (2). The few drugs crossing BBB by passive diffusion present a molar mass under 400-500 Da and a very high lipid solubility (1).

Consequently, drug research and development has focused for many years on attempting to overcome this problem. Several solutions have been proposed, such as drug chemical modifications to enhance their brain permeability or improved formulation strategies. Nanotechnologies have also been used with various success rates: liposomes, dendrimers, lipidic or polymeric nanoparticles (NPs), inorganic NPs, etc. However, few nanomaterials developed for CNS have reached the clinical investigation stage (3). Polymeric NPs engineered from biodegradable and biocompatible materials can encapsulate unmodified therapeutic molecules, whilst exhibiting sustained release profiles as well as good chemical and biological stabilities (4),(2). Amongst polymeric NPs, polyester-PEG –based nanoparticles (NPs) display favorable features to overcome BBB limitations.(5, 6) The presence of a flexible and highly hydrophilic corona (such as PEG) decreases nonspecific protein adsorption (referred to as opsonization) onto the NPs surfaces (7). This characteristic minimizes NP elimination by the reticuloendothelial system. Therefore, PEGylated NPs manifest extended blood circulation time which can increase the accumulation of NPs in targeted tissues such as brain (2, 8). *In vivo* studies have shown that PEG coating improves the NPs accumulation and diffusion in the brain parenchyma (9-12).

The interactions of brain vascular endothelial cells with NPs are mediated by the properties of the NP surface (13). Many physicochemical variables influence NPs uptake including particle size (14), shape (15), charge (16), surface chemistry (17), and mechanical properties (18). PEG chain conformation could also influence NPs cellular uptake (19). Several NP-conjugated ligands enhance BBB penetration via direct interaction with specific BBB

receptors (5). Ligand-receptor interactions can be influenced by NP PEG corona characteristics including PEG chain length and surface density (20, 21). The properties of the NPs surface are also related to the composition of the protein corona (22). A few studies have reported a direct influence of the protein corona on brain uptake (23, 24), and therefore some components of the protein corona could act as targeting ligands (12, 25).

The NPs transport across the BBB involves active transcytosis mechanisms (5) though these mechanisms are not fully elucidated. It can thus be hypothesized that the physicochemical parameters of the PEG corona of the particle surface can influence NPs endocytosis and transcytosis. The specific role of PEG chain length on the endocytosis and the transcytosis of polymeric nanocarriers crossing through the BBB have not been methodically explored. In this study, we systematically explored the role of PEG length on brain vascular endothelial cell translocation. We were able to specifically isolate the role of PEG chain length on the uptake and transcytosis by controlling the key physicochemical features of PLA-based NPs. The uptake and transcytosis mechanisms were explored by using a vascular endothelial brain cell model.

3.3 Methods

All chemical and biological reagents are fully described in supplementary materials (SM) in Annexe 1.

3.3.1 Polymer syntheses and characterizations

Diblock PLA-PEG_X polymers (X: 1, 2, 5,10 kDa) were obtained by ring-opening polymerization (ROP) in presence of DBU, as previously reported.(26) Synthesis procedures are detailed in SM (Tables S1 to S4). Fluorescently-labelled polymer (PLA-pyrene butanol, FLU-PLA) was similarly synthesized by using 1-pyrenebutanol as a polymerization initiator. Benzyl ester-end capped PLA (PLA-BZ, control PLA) was synthesized by initiating ROP reaction by benzyl alcohol.

The chemical composition of polymers was characterized by ¹H NMR analyses (Figure S1). The number-average (*M_n*), weight-average (*M_w*) molecular weights and polydispersity indexes (PDI) of polymers were obtained by gel permeation chromatography (GPC) in tetrahydrofuran (Table S2).

3.3.2 Nanoparticle preparation, purification and physicochemical characterizations

NPs were prepared by the nanoprecipitation method (27) without addition of any surfactant. Similar hydrodynamic diameters were obtained through adjustments of the polymer concentrations in the organic phase (*See SM*). NPs were purified by dialysis. An additional step of purification and concentration of NPs was carried out by Tangential Flow Filtration (TFF, Table S5). NP suspensions were concentrated between 3 to 5 times and remained stable at 4°C for at least 2 weeks.

NP hydrodynamic diameters (z-average, D_H), size polydispersity indexes (Pdl) and ζ -potentials (ZP) were measured prior and after NP purification by dialysis and TFF by Dynamic Light Scattering (DLS) and Electrophoretic Light Scattering (ELS).

The chemical composition, as well as purification efficiencies of dialysis and TFF to remove free PEG, were verified by ^1H NMR analyses and diffusion coefficient DOSY measurements (Figure S2, Table S7). Determination of PEG surface density on the NP surfaces was performed by suspending concentrated NPs in D_2O and analyzing by ^1H NMR. (28) Specific details are provided in SM (Equations S1 to S9).

To evaluate the colloidal stability of nanoparticles, two techniques were employed: Static Multiple Light Scattering or SMLS (Turbiscan™) and DLS at 37°C during 20 min. NPs hydrodynamic diameters and Pdl were measured immediately ($t=0\text{h}$) and one-day later ($t=24\text{h}$) for 20 min at 2-min intervals (three measurements of five runs at 37 °C).

For each suspension medium, size increment ratios were calculated as follows:

Equation 1
$$\text{size increment ratio} = \frac{NP \text{ size } t_x}{NP \text{ size } t_0}$$

where t_0 is the time of first acquisition and t_x the time of incremented acquisition.

3.3.3 *In vitro* biological assays

The mouse brain endothelial cell line bEnd.3 (ATCC CRL-2299™) was used within the 10 first passages of the received batch.

Cell viability. Cell viability was determined by MTT assays (see details in SM).

Endocytosis rates. bEnd.3 monolayers were exposed to FLU-PLA or FLU-PLA-PEG_x nanoparticles at a final concentration of 100 µg×mL⁻¹ per well (n=4 wells per condition) and incubated for 3 h. All incubation and washing media were then collected, whereas cells were trypsinized, centrifuged and resuspended in Opti-MEM™ to a final density of 20-25,000 cells×mL⁻¹. Cell pellets were destroyed by sonication, followed by centrifugation to separate cell debris from cytosol, solubilized organelles and biomolecules. Fluorescently-labelled NPs which had been endocytosed by cells were retrieved in the supernatants. Absorbances of incubation media, washing media and supernatants of lysed cells were then measured by spectrofluorometry (exc/em: 344/379 nm, Safire, Tecan, USA). The quantity of NPs was calculated from a calibration curve established for each NP type.

For *direct quantification* by cell lysis, the endocytosis rate was calculated as follows (Eq. 2):

Equation 2
$$\% \text{ endocytosis} = \frac{Q_{3h}}{Q_{total}} \times 100$$

with Q_{total} : total quantity of NPs (µg) deposited in the cell medium at time 0; Q_{3h} : quantity of NPs (µg) retrieved in the cells after a 3-h incubation.

For *indirect quantification*, the endocytosis rate was calculated as follows (Eq. 3):

Equation 3
$$\% \text{ endocytosis} = \frac{(Q_{total} - Q'_{3h})}{Q_{total}} \times 100$$

with Q_{total} : total quantity of NPs (µg) deposited in the cell medium at time at time 0; Q'_{3h} : quantity of NPs (µg) retrieved in the incubation and washing media after a 3-h incubation.

Endocytosis mechanisms. bEnd.3 monolayers were treated by either 200 μM GEN, 3.14 μM CPZ, 20 μM PS2 or 100 μM EIPA for 30-min.(29) Then media were replaced by the same inhibition media complemented with FLU-PLA-PEG₂₀₀₀, FLU-PLA-PEG₅₀₀₀ or FLU-PLA-PEG₁₀₀₀₀ nanoparticles (100 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$, n=3). After a 3 h incubation, all incubation media and washing media were collected and processed as above-mentioned. The experiments of endocytosis energy dependence were carried out by pre-incubating the cells at 4°C for 30 min, and then incubating the cells with NPs (100 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$, n=3) for 2 h at 4°C. The cells treated for 2 h with NPs at 37°C were used as reference. Endocytosis rates were calculated according to Equation 3.

The relative endocytosis rate (rel. E%) was defined as:

Equation 4
$$\text{rel. E\%} = \frac{\text{E\% w/ inhibitor}}{\text{E\% w/o inhibitor}} \times 100$$

where E% w/ inhibitor is the endocytosis rate calculated in the presence of a given inhibitor and E% w/o inhibitor is the endocytosis rate observed in the absence of inhibitors.

Transcytosis rates. bEnd.3 monolayers were grown on 24-well HTS Transwell® plates (porosity 0.4 μm) for 3 days until full confluence. Cells were then incubated for 3 h or 24 h with FLU-PLA or FLU-PLA-PEG_x nanoparticles (200 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$, n=4, donor compartment). Untreated cells and membrane alone were used as controls. Then all incubation (donor and receiver) and washing media were collected. Absorbances of all media were then measured by spectrofluorometry as previously described.

The transcytosis rate (%T) was calculated as follows (Eq. 5):

Equation 5
$$\%T = \frac{(Q_{\text{receiver well}}^{3/24})}{Q_{\text{donor well}}^0} \times 100$$

with $Q_{\text{donor well}}^0$: total quantity of NPs (μg) deposited on the cells in the donor well at time 0;
 $Q_{\text{receiver well}}^{3/24}$: quantity of NPs (μg) retrieved in the receiver well and washing media after a 3-h or a 24-h incubation.

The apparent permeability coefficient (P_{app} , cm s⁻¹) was obtained by the following equation 6, as proposed by Hubatsch et al. (30):

Equation 6
$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

where dQ/dt (μg/s) is the linear apparent transcytosis rate from apical to basolateral chambers, C_0 is the initial concentration in the apical chamber (μg/mL) A is the surface area of the bEnd.3 monolayers ($A = 0.33$ cm²).

At the end of the experiment, the cell monolayer integrity was assessed by measuring the TEER and the permeability of FITC-dextran (150 kDa) in each well for 1 h. TEER values at the end of the experiment were not significantly different from basal measurements in presence of bEnd.3 cell monolayers. The permeability of FITC-dextran was in average 4 times less in wells with cells compared to wells without cells and similar to that of untreated cell monolayers.

Transcytosis mechanisms. They were explored through endocytosis inhibition, in a similar way as abovementioned, in presence of uptake inhibitors: GEN (200 μM), PS2 (20 μM) or EIPA (100 μM). After a 30-min incubation, media were removed and replaced by the same media complemented with FLU-PLA-PEG₂₀₀₀, FLU-PLA-PEG₅₀₀₀ or FLU-PLA-PEG₁₀₀₀₀ nanoparticles (200 μg×mL⁻¹, n=3). Cells treated only with NPs served as controls (n=3). Cells were subsequently incubated for 3 h or 24 h, prior collecting all incubation media and washing media.

Absorbances of incubation and washing media were then measured by spectrofluorometry as previously described. Transcytosis rates were calculated according to Equation 5.

The relative transcytosis rate (rel. T%) was defined as (30):

Equation 7
$$\text{rel. T\%} = \frac{T\%_{w/\text{inhibitor}}}{T\%_{w/o \text{ inhibitor}}} \times 100$$

where $T\%_{w/\text{inhibitor}}$ is the transcytosis rate calculated in the presence of a given inhibitor and $T\%_{w/o \text{ inhibitor}}$ is the transcytosis rate observed in the absence of inhibitors.

3.3.4 Statistical analyses

Statistics were performed by using IBM® SPSS® Statistics 24. Thorough details are provided in the SM section.

3.4 Results

3.4.1 Polymer syntheses

PLA-PEG diblock copolymers were synthesized by ROP using PEG chains as macroinitiators (Figure 3.1). This synthesis route yielded more homogenous diblock polymers than grafting PEG on PLA chains by esterification. Hence NP surface properties are more effectively controlled (31). PLA-PEG diblock assemblies by nanoprecipitation result in polymeric nanoaggregates whenever PEG content is higher than 20% w/w, whereas weight ratios lower than 20% lead to solid nanoparticles (27, 32). Both structures present different physical properties (33) and colloidal stability in biological environments. In order to ensure the successful synthesis of solid NPs, the polymerization reaction was optimized to obtain PLA-PEG diblocks with PEG ratios lower than 20% w/w (Tables S1 & S2, Figure S1). A special emphasis was placed on polymer purification to remove free PEG (Table S3), which can unfavorably impact PEG content, leading to overestimated grafting rates. We thus developed a multistep purification procedure (Table S4) resulting in free residual PEG representing less than 0.5% mol/mol of starting materials (Figure S2).

In order to enable the tracking and quantification of NPs, PLA was modified with pyrene butanol (Figure 3.1). This fluorescent molecule (em./exc. 344/379 nm) is highly hydrophobic and therefore prone to be encapsulated into the PLA core, preventing the fluorophore to interfere with NP surface properties. Moreover, the covalent link warranted a minimal risk of fluorophore leakage in biological environments. Using pyrene butanol as the chain initiator, the ROP of lactide in presence of DBU yielded to monodisperse FLU-PLA chains (Table S2).

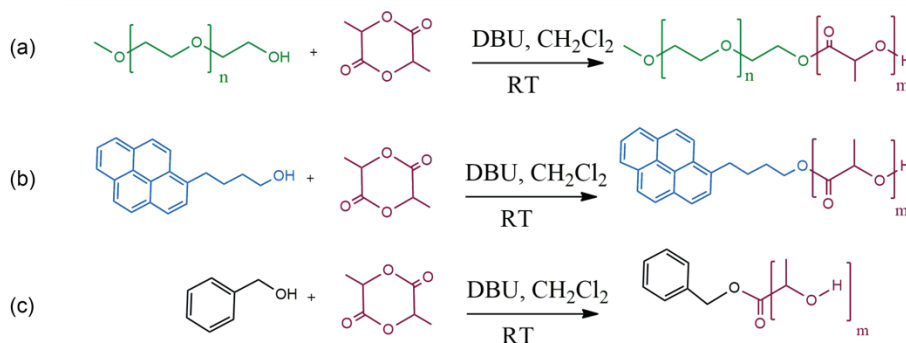


Figure 3.1: Ring-opening polymerization (ROP) a) synthesis of diblock PLA-PEG_x polymers; b) synthesis of PLA-Pyrene (FLU-PLA) polymers; c) synthesis of benzyl ester-capped (PLA-BZ) polymer.

A library of standardized PLA-PEG_x NPs was then prepared by the nanoprecipitation technique. By adjusting the polymer concentration in acetone, the resulting purified NPs all displayed mean hydrodynamic diameters (z-average) between 99 and 105 nm, with polydispersity index (PDI) values around 0.1, attesting to a narrow particle distribution (Table 1 and S9). Non-PEGylated NPs were also synthesized from PLA-BZ as controls. The addition of 10% w/w FLU-PLA into the formulation did not impact the NP diameters and PDIs (Table 1). The multistep purification process was efficient in eliminating residual solvent molecules, as demonstrated by the important decrease in hydrodynamic diameters (Tables S5 and S6). We analyzed the TFF wastes and measured by DOSY the diffusion coefficient of the PEG attached to NPs and the free PEG. The results showed that the purification steps led to a sharp decrease in free PEG (Table S7). More importantly, the ζ -potential values were very similar between unlabeled and fluorescently-labeled NPs (Table 1), suggesting that fluorescent molecules were mainly embedded inside the PLA core and did not alter the NP surface. PEG surface quantification by ¹H-NMR showed similar PEG surface densities for all NP batches, regardless of the considered PEG chain length (Table 1). Moreover, the calculated surface density values favored a brush conformation, as established by previous works (28).

Tableau 3.1: PLA-PEG nanoparticle characteristics after complete purification.

n=9 (3 independent batches, 3 measurements per batch).

NP type	D _H (z-average, nm)	PdI	ZP (mV)	PEG density (chain/nm ²)
PLA (no PEG)	125 ± 1	0.11 ± 0.01	-30.4 ± 2.5	-
FLU-PLA	118 ± 1	0.12 ± 0.01	-31.7 ± 0.8	-
PLA-PEG ₁₀₀₀	104 ± 3	0.13 ± 0.03	-19.3 ± 0.1	0.176 ± 0.011
FLU-PLA-PEG ₁₀₀₀	105 ± 5	0.14 ± 0.02	-18.2 ± 0.6	0.165 ± 0.003
PLA-PEG ₂₀₀₀	102 ± 2	0.11 ± 0.01	-13.2 ± 0.1	0.210 ± 0.002
FLU-PLA-PEG ₂₀₀₀	107 ± 4	0.12 ± 0.03	-12.0 ± 0.2	0.170 ± 0.002
PLA-PEG ₅₀₀₀	105 ± 1	0.09 ± 0.01	-10.9 ± 1.3	0.170 ± 0.003
FLU-PLA-PEG ₅₀₀₀	99 ± 3	0.11 ± 0.01	-11.1 ± 0.1	0.190 ± 0.001
PLA-PEG ₁₀₀₀₀	99 ± 2	0.09 ± 0.01	- 6.2 ± 0.5	0.186 ± 0.003
FLU-PLA-PEG ₁₀₀₀₀	98 ± 1	0.10 ± 0.02	-5.6 ± 0.5	0.175 ± 0.003

3.4.2 Colloidal stability of NPs

The colloidal stability of all nanoparticles was studied at 37°C by two complementary techniques, DLS and SMLS. SMLS is an optical method used to assess particle size changes and sample destabilization. NPs were suspended in MilliQ water at the end of the purification process, which therefore constituted the storage medium. On the other hand, NPs tested in cell culture media are exposed to high saline and protein contents. Both factors are known to induce NP aggregation(34) and to impact cellular uptake. (35) Therefore the stability kinetics of our NP library was evaluated in PBS (high saline content) and PBS supplemented with 3% BSA (serum mimetic). As expected, the smaller the PEG length, the higher the destabilization (Figures 3.2 & S3, S4). Control PLA NPs precipitated quasi-instantaneously in contact with PBS, as evidenced by a significant increase in size and PdI (Figure 3.2 a). However, the surface adsorption of BSA tampered this phenomenon. Similar results were obtained for PLA-PEG₁₀₀₀ NPs, but with slower kinetics and lower amplitude. When PEG chain length was $\geq 2,000$ g \times mol⁻¹, a greater colloidal stability was observed over 24 h, demonstrated by steadier backscattering percentages and no change in particle sizes (Figures 3.2 and S3).

Similar results were observed from DLS analysis (Figures 3.2 and S4). NPs prepared with PLA and PLA-PEG₁₀₀₀ were highly unstable in PBS (precipitation appeared quasi-instantly for PLA and increased with time for PLA-PEG₁₀₀₀), whereas all other nanosuspensions showed no sign of aggregation. PDI values during the same experiment demonstrated (i) no sign of aggregation for NPs placed in water, either at t=0h or t=24h; (ii) a complete aggregation for PLA and PLA-PEG₁₀₀₀ NPs at t=24 h whereas for PEG length $\geq 2,000$ g \times mol⁻¹, PDI values remained unchanged; (iii) PDI values in PBS with 3% BSA were instantly doubled (~ 0.2) compared with values obtained in water (≤ 0.1) but remained unchanged throughout the rest of the experiments.

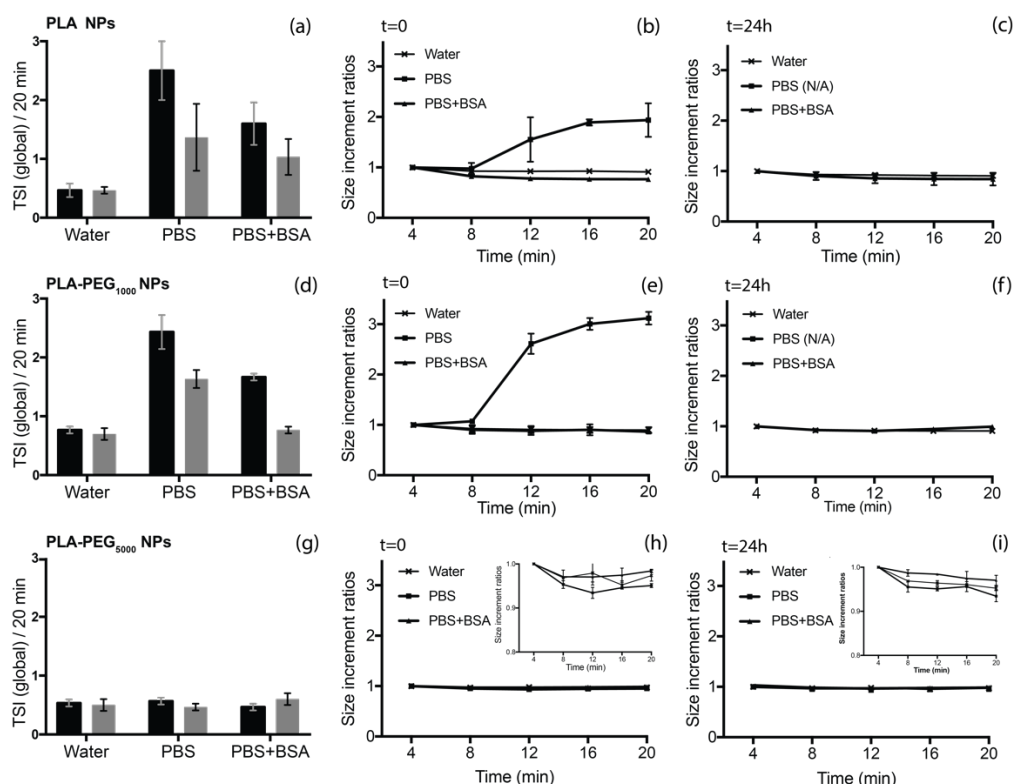


Figure 3.2: NP colloidal stability in various media as evidenced by the global TSI value a) PLA, d) PLA-PEG₁₀₀₀ and g) PLA-PEG₅₀₀₀ NPs. Black bars: t=0 h; grey bars: t=24h. n=3 separate experiments. Corresponding size increment ratios in the same media at t=0h for b) PLA, e) PLA-PEG₁₀₀₀ and h) PLA-PEG₅₀₀₀ NPs and at t=24 h for c) PLA, f) PLA-PEG₁₀₀₀ and i) PLA-PEG₅₀₀₀ NPs. n=9 (3 measurements per batch, 3 batches).

3.4.3 Endocytosis in brain endothelial cells

Endocytosis rates and mechanisms were explored in bEnd.3 cell monolayers, an *in vitro* model of the BBB. This model is regarded as appropriate to study NPs endocytosis and transcytosis because of its low permeability to macromolecules and NPs due to its high presence of tight junctions (24, 36, 37).

Cell viability assays did not show any significant cytotoxicity after 24h incubation with NPs except for PLA-PEG₁₀₀₀ and PLA-PEG₂₀₀₀ NPs, for which the cell viability decreased significantly at the highest concentrations. (Figures S5 to S7).

Two methods were used to assess the endocytosis extend, *i.e.* direct quantification of cell uptake by lysate fluorescence and indirect quantification of residual NPs in incubation and washing media. The two methods provided consistent results. Endocytosis rates obtained by direct and indirect methods are displayed respectively in Figures 3.3 a and S8.

Endocytosis rate (E%) was significantly impacted by PEG chain length. Non-PEGylated NPs yielded 55 ± 5 % internalization, the highest observed rate. For PEGylated NPs, the highest endocytosis rates were obtained for NPs whose PEG length was $\geq 5,000$ g \times mol⁻¹. Similar trends were observed with flow cytometry experiments (*See SM*) as shown in Figure S9. However, flow cytometry was found a less adequate technique to evaluate the internalization of PEGylated NPs tagged with fluorescent pyrene butanol. The florescence intensity of pyrene varied depending on PEG chain length corona on surface of NPs. Fluorescence microscopy showed that NPs PLA-PEG₅₀₀₀ and PLA-PEG₁₀₀₀₀ were mainly located near the cell nuclei at 24 h (Figures S11, S12).

Endocytosis experiments performed at 4°C showed a 90% reduction in NPs uptake (Figure S10). These results confirmed that the NPs internalized through an energy-dependent mechanism. It also confirmed that the washing steps removed most of loosely membrane-bound NPs during the assays with specific inhibitors.

Specific endocytosis inhibitors were then used to discriminate the preferential uptake routes according to PEG chain length, namely 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA, macropinocytosis inhibitor), genistein (GEN, inhibiting caveolae-mediated endocytosis),

chlorpromazine (CPZ, which inhibits clathrin disassembly and receptor recycling to the plasma membrane during clathrin-mediated endocytosis) and (PS2, competitively inhibiting clathrin-mediated endocytosis by blocking clathrin terminal domain).(38) Results after a 3-h incubation demonstrated that only PS2 and EIPA inhibitors caused a significant decrease in cellular uptake, regardless of the PEG chain length (Figures 3.3 b ,c and d).

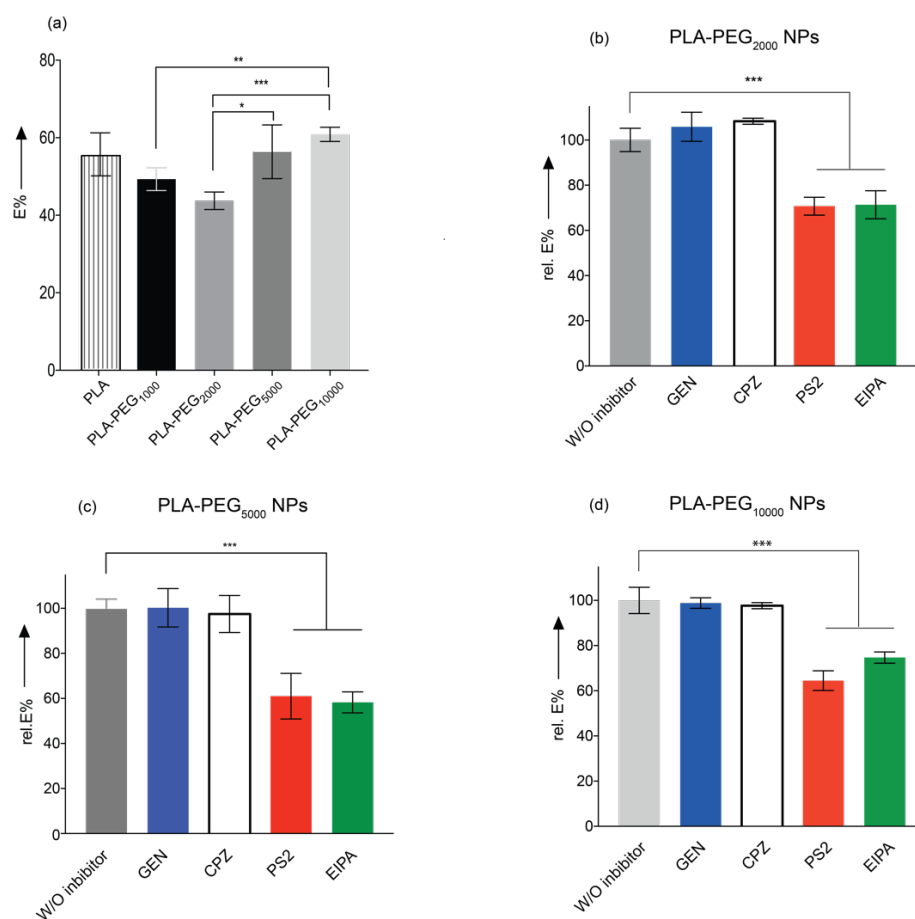


Figure 3.3: a) Endocytosis rates (E%) as measured by the direct method after a 3-h incubation, as a function of PEG length. Results are the means \pm SD of 4 separate incubations. Relative endocytosis rates b) for PLA-PEG₂₀₀₀, c) PLA-PEG₅₀₀₀ and d) PLA-PEG₁₀₀₀₀ NPs in presence of various cellular uptake inhibitors. Grey bars: control, without inhibitor (100 % rel. E%); blue bars: GEN; white bars: CPZ; red bars: PS2; green bars: EIPA. Results are the means \pm SD of 4 separate incubations. * = $0.01 < p < 0.05$, ** = $0.001 < p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.4.4 Transcytosis assays

The transcytosis capacities of PEGylated NPs by bEnd.3 monolayers after 3-h and 24-h incubation periods were evaluated. Trans-Epithelial Electrical Resistance (TEER) measurements ($\text{TEER} \geq 35 \Omega \cdot \text{cm}^2$) and the permeability of a 150-kDa FITC-dextran were used to monitor the cell monolayer integrity (Figure S13). Results demonstrated that the bEnd.3 cell monolayers were functional and intact for the duration of the transcytosis assays.

The translocation efficiencies for PEGylated NPs were compared, on Transwell® membranes with or without bEnd.3 cell monolayers. In the case of membranes without cells, almost no translocation was detected after 3h as simple diffusion across the membrane was negligible (Figure S14 a). The maximal translocation rate after 24h was 15% (Figure S14 b).

In presence of bEnd3 monolayers, no transcytosis could be quantified for PLA NPs (no PEG), either at short (3 h) or long (24 h) incubation times (Figure S14). A low transcytosis rate was noted in the case of PLA-PEG₁₀₀₀ NPs, with a maximum of 20% at 24 h (Figure 3.4 a and b). Transcytosis rates significantly increased for higher PEG lengths (Figure 3.4 a) at short incubation times. Non-significant differences in transcytosis rates were observed in between groups whenever PEG chain lengths were $\geq 2,000 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$. At 24h, transcytosis rates were significantly impacted by PEG chain length (Figures 3.4 b & S10). For PEG lengths from 1,000 to $5,000 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$, transcytosis rates increased significantly and reached a maximum for PLA-PEG₅₀₀₀ and PLA-PEG₁₀₀₀₀ NPs (~ 62% of the initial NPs dose were translocated).

The apparent permeability coefficient (P_{app}) was calculated to evaluate the transcytosis kinetics. (30) P_{app} reflects the global NP flux through the bEnd.3 monolayers for a given time period. Analysis of P_{app} data for the 3-h incubation time showed low P_{app} values for PLA-PEG₁₀₀₀ NPs. Those values tripled for PEG length $\geq 1,000 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ (Figure 3.4 c, plain line). After 24-h incubation, P_{app} presented a decrease for PLA-PEG₁₀₀₀ and PLA-PEG₂₀₀₀ NPs. On the other hand, P_{app} levels remained the same for PLA-PEG₅₀₀₀ and PLA-PEG₁₀₀₀₀ NPs (Figure 3.4 c, dashed line).

The dependence of transcytosis rates on specific endocytic mechanisms were thereafter examined through uptake inhibition. All tested inhibitors significantly reduced transcytosis rates (Figure 3.4 d). In the case of PLA-PEG₂₀₀₀ NPs, the inhibition of the various endocytic pathways

had a low but similar impact on transcytosis rates (decreased by 20%). A similar but stronger trend was also observed for PLA-PEG₁₀₀₀₀ NPs, with a decrease of more than 60%. However, PLA-PEG₅₀₀₀ NPs were dissimilarly affected by the presence of the inhibitors. Inhibition of calveolae- and clathrin-mediated endocytoses led to a moderate decrease in transcytosis rates (~20%), whereas the blocking of the macropinocytosis pathway strongly reduced transcytosis (~ 60%). In brief, the macropinocytosis pathway appeared highly involved in transcytosis for NPs either coated with PEG₅₀₀₀ or PEG₁₀₀₀₀ (*i.e.* long chains).

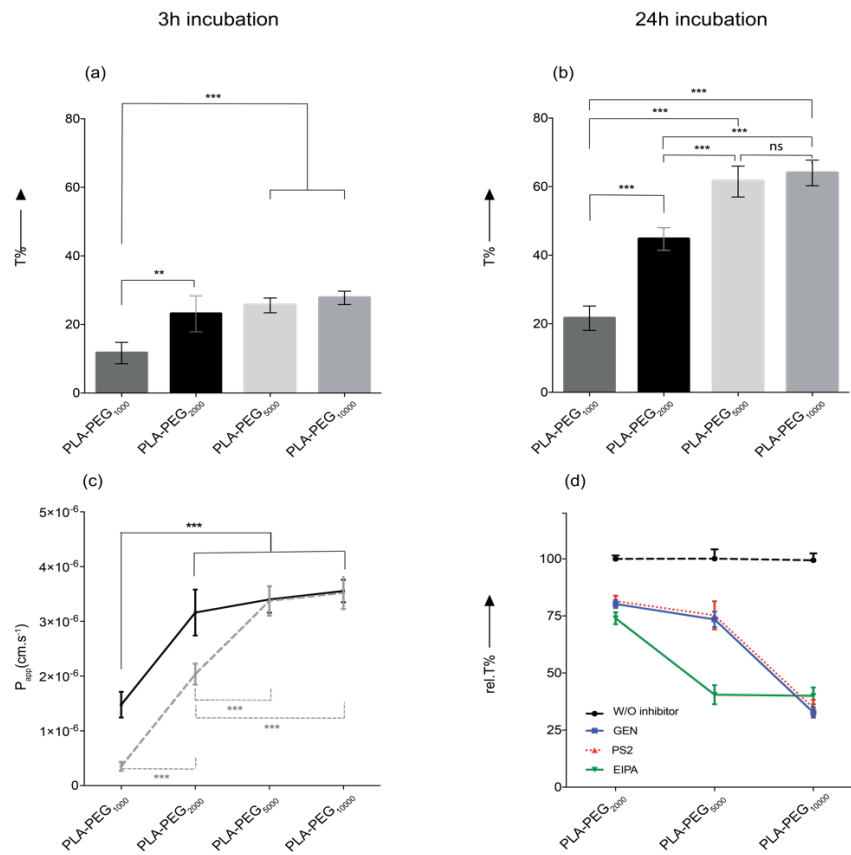


Figure 3.4: Translocation efficiency (T%) as a function of PEG length for a) a 3-h incubation and b) a 24-h incubation. c) Apparent permeability at 3 h (plain line), and 24 h (dashed line). d) Relative transcytosis rates (rel. T%) after a 24-h incubation, in presence of various cellular uptake inhibitors: without any inhibitor (black dashed line, reference 100%), GEN (dotted red line), PS2 (blue plain line) and EIPA (green plain line). Results are the mean \pm SD of 6 separate incubations. * = 0.01 < p < 0.05, ** = 0.001 < p < 0.01, *** p < 0.001.

3.5 Discussion

PEGylated NPs are associated with improved characteristics for drug delivery, antifouling properties and brain distribution. Adsorption of specific plasmatic proteins onto NP surface was found necessary to prevent non-specific cellular uptake (39, 40), and to favor receptor-mediated endocytosis mechanisms, e.g. ApoE-based BBB targeting (23, 24). Differences in protein adsorption onto NP surface have been directly related to PEG chain length and conformation (41). On the other hand, some reports have shown that NP PEGylation significantly decreased cellular uptake compared to unmodified surfaces, especially for high molecular-weight PEG ($M_w \geq 2,000 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$). (42, 43) These apparently contradictory data prompted us to determine whether PEG length, *per se*, could trigger differential uptake and transcytosis in brain endothelial cells. To specifically assess the effect of PEG length on NP transcytosis, we sought to minimize the various biases which could affect our observations. First, size and state of aggregation are known to greatly impact both endocytosis extent and transcytosis capacity (44). Thus, a NPs library with similar hydrodynamic diameters and same PEG surface density was used in experiments (Table 1). The observed increase of zeta-potentials is related to the increasing shielding effect from longer PEG chains (Table 1). To strictly observe the PEG chain length effect, we chose not to add serum during all the endocytosis and transcytosis experiments. This approach was used to avoid adsorptive-mediated transcytosis (45) promoted by various patterns of protein adsorption onto NP surface according to PEG chain length (39)-(46). The presence of serum does not affect the uptake mechanism and intracellular trafficking except for targeted strategies (47). Moreover, serum-free medium improves the barrier function of bEnd.3 cells by stimulating the expression of tight junction proteins and thus decreasing permeability (37).

Figure 3.2 compares the colloidal stability of NPs in the presence and absence of serum proteins. Plain PLA NPs aggregated within minutes when placed in medium with ionic strength similar to that of plasma. This behaviour has already been reported for uncoated NPs (48). The addition of a high protein concentration in the medium enhanced PLA NPs stability. Nonetheless, the low protein concentration in our *in vitro* experiments was not sufficient to

stabilize non-PEGylated or PLA-PEG₁₀₀₀ NPs. These PLA aggregates were able to be internalized, as previously reported by others (49) but unable to translocate through the endothelial monolayers (Figure S10 a and b). This condition was therefore excluded from data interpretation.

Our results demonstrated that PEGylated NPs followed the same endocytosis and transcytosis patterns. Transcytosis requires an initial endocytosis step, which may, or may not, lead to cellular trafficking and exocytosis (50). At short incubation times (3 h), NP uptake by endothelial cells increased with PEG chain length. A similar trend was observed for PEGylated chitosan NPs by Yang *et al.* (51). The slightly higher uptake rate observed with PLA-PEG₁₀₀₀, as compared with PLA-PEG₂₀₀₀, could also be related to the NP instability in saline media and subsequent formation of aggregates. Non-phagocytic cells, such as endothelial cells, can uptake particles by at least four different endocytosis pathways, namely macropinocytosis, clathrin-dependent endocytosis (CDE, or clathrin-mediated endocytosis, CME), calveolea-mediated endocytosis (CvME) and clathrin/calveolae-independent endocytosis (CIE) (52). In our case, PEGylated NPs preferentially used the CME and macropinocytosis routes, which was in agreement with previous studies based on nanoobjects with diameters in the 40-200 nm range (43, 53).

Regarding transcytosis, our results clearly demonstrated the necessity of cell presence for an active translocation through the Transwell® system. These results were in accordance with Gromnicova *et al.*'s findings where a large fraction of PEGylated gold NPs were trapped into the Transwell® membrane during a permeability assay (29). Considering the results from TEER and permeability assays (Figure S13), these transcytosis rates can be interpreted as the result of actual cell translocation and not as the consequence of permeable cell monolayers (paracellular pathway). Moreover, NP transcytosis rates were found significant only when a PEG corona was present. This trend was also stated in a recent work by Ivask *et al.* who found that the surface functionalization of iron oxide nanoparticles with PEG chains led to a substantial increase in NP translocation compared to bare IONs (54). Our study revealed the dependence of transcytosis rates on PEG length, with the highest rates observed for the longest PEG chains. The transcytosed fraction increased with time, reaching two-third of the processed NPs at 24h for the longest PEG chains.

Although the uptake and transcytosis of NPs in BBB model systems have been described in several studies, the mechanisms behind these processes remain unclear. Many cell lines can internalize polymeric NPs but it is still uncertain which NP characteristic plays the most crucial role in determining endocytic and intracellular trafficking pathways. Caveolae-mediated endocytosis (adsorptive endocytosis) leads to the higher rates of NP transcytosis in peripheral vascular endothelia (55) but not for the BBB (56). In our case, all tested inhibitors impacted the transcytosis rates but differently, with a markedly decrease in NP translocation for higher PEG lengths. Macropinocytosis seemed to play a pivotal role whenever PEG length was $\geq 5,000$ g \times mol⁻¹. Our results are in line with those obtained with cholesterol-PEG co-modified poly (N-butyl) cyanoacrylate NPs in the bEnd.3 model, revealing a main involvement of the macropinocytosis pathway (53).

It has been shown that soft NPs are internalized preferentially via macropinocytosis (18). The PEG layer thickness changes sharply from PLA-PEG₂₀₀₀ NPs to PLA-PEG₅₀₀₀ NPs (28). This change affects NP outer layer mechanical properties. Also, the Glass Transition Temperature (*T_g*) of diblock polymers decreases with PEG chain length from 34.2°C for PLA-PEG₂₀₀₀ to 23.6°C for PLA-PEG₅₀₀₀ (DSC data not shown). This decrease could reduce the Young's modulus of the entire particle. A change in the mechanical surface properties of the NPs could impact the NP-cell interactions and therefore influence the preferential cell entry pathway. To confirm this hypothesis, direct measurements of NP mechanical properties would be necessary. However, these types of measurement are not trivial and technically challenging to perform.

As a general rule, none of the tested inhibitors only affects a single specific pathway (57). For instance, EIPA (amiloride) is a known inhibitor of macropinocytosis and other pathways, such as ICAM- and PECAM-mediated endocytosis (58). However, these latter pathways are unlikely to play a role for endocytosis and transcytosis of PEGylated NPs which are not functionalized by CAM molecules.

In summary, our study demonstrated that PLA NPs coated with high molecular weight PEG represent a viable strategy to favor BBB translocation due to enhanced stability, cellular uptake, and improved transcytosis. Furthermore, the toxicity profile must be considered for the final choice of PEG chain length. Although PEG is typically considered as an innocuous

chemical, several reports have pointed out the generation of IgM (59) and hypersensitivity reactions in patients caused by PEG (60). However, toxicity data regarding PEG-coated nanoparticles are still scarce and require further systematic investigations.

Most of previous works on drug delivery to the brain were performed via PEG₂₀₀₀-coated nanomaterials (9-11). These *in vivo* results were of somehow moderate success. Our findings open a new horizon to enhance the drug delivery to CNS tissues, by carefully examining PEG length and preferential endocytic mechanisms. Consequences of the present results on active targeting strategies are yet to be investigated in future works.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Acknowledgments

The authors wish to thank Pr. Jeanne Chain for constructive discussions and helpful suggestions. Dr Jean-Michel Rabanel is acknowledged for valuable advices in polymer synthesis and critical revision of the manuscript. Steven Sanche and Guillaume Bonnefois are acknowledged for their noteworthy help in data statistical analysis.

Funding Sources

This research project was funded by “Fonds de Recherche du Québec, Nature et Technologies” (FRQ-NT, Government of Québec, Canada; grant # 191486). Equipment used in this study was acquired through a CFI grant (Canada Foundation for Innovation; grant #34227).

3.6 References

1. Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Couvreur P. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain? *International journal of pharmaceutics*. 2005;298(2):274-92.
2. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2001;70(1-2):1-20.
3. van der Meel R, Vehmeijer LJ, Kok RJ, Storm G, van Gaal EV. Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(10):1284-98.
4. Rabanel JM, Faivre J, Paka GD, Ramassamy C, Hildgen P, Banquy X. Effect of polymer architecture on curcumin encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: Toward a drug delivery nano-platform to the CNS. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2015;96:409-20.
5. Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*. 2016;235:34-47.
6. Sanchez-Lopez E, Ettcheto M, Egea MA, Espina M, Calpena AC, Folch J, et al. New potential strategies for Alzheimer's disease prevention: pegylated biodegradable dexibuprofen nanospheres administration to APPswe/PS1dE9. *Nanomedicine*. 2017;13(3):1171-82.
7. Nie S. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine*. 2010;5(4):523-8.
8. Xu X, Ho W, Zhang X, Bertrand N, Farokhzad O. Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy. *Trends in Molecular Medicine*. 2015;21(4):223-32.
9. Calvo P, Gouritin B, Chacun H, Desmaële D, D'Angelo J, Noel J-P, et al. Long-Circulating PEGylated Polycyanoacrylate Nanoparticles as New Drug Carrier for Brain Delivery. *Pharmaceutical Research*. 2001;18(8):1157-66.
10. Brigger I, Morizet J, Aubert G, Chacun H, Terrier-Lacombe M-J, Couvreur P, et al. Poly (ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;303(3):928-36.
11. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;99(Pt A):28-51.
12. Nance EA, Woodworth GF, Sailor KA, Shih T-Y, Xu Q, Swaminathan G, et al. A dense poly (ethylene glycol) coating improves penetration of large polymeric nanoparticles within brain tissue. *Science translational medicine*. 2012;4(149,149):149ra19.
13. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2010;145(3):182-95.
14. Wang S-H, Lee C-W, Chiou A, Wei P-K. Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *Journal of nanobiotechnology*. 2010;8(1):1.

15. Chithrani BD, Chan WC. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano letters*. 2007;7(6):1542-50.
16. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 2010;31(13):3657-66.
17. Albanese A, Tang PS, Chan WC. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*. 2012;14:1-16.
18. Banquy X, Suarez F, Argaw A, Rabanel J-M, Grutter P, Bouchard J-F, et al. Effect of mechanical properties of hydrogel nanoparticles on macrophage cell uptake. *Soft Matter*. 2009;5(20):3984-91.
19. Hu Y, Xie J, Tong YW, Wang C-H. Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells. *Journal of Controlled Release*. 2007;118(1):7-17.
20. Hak S, Helgesen E, Hektoen HH, Huuse EM, Jarzyna PA, Mulder WJM, et al. The effect of nanoparticle polyethylene glycol surface density on ligand-directed tumor targeting studied in vivo by dual modality imaging. *ACS nano*. 2012;6(6):5648-58.
21. Dai Q, Walkey C, Chan WC. Polyethylene glycol backfilling mitigates the negative impact of the protein corona on nanoparticle cell targeting. *Angewandte Chemie (International ed in English)*. 2014;53(20):5093-6.
22. Ke PC, Lin S, Parak WJ, Davis TP, Caruso F. A Decade of the Protein Corona. *ACS nano*. 2017;11(12):11773-6.
23. Kim HR, Gil S, Andrieux K, Nicolas V, Appel M, Chacun H, et al. Low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis of PEGylated nanoparticles in rat brain endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007;64(3):356-64.
24. Wagner S, Zensi A, Wien SL, Tschickardt SE, Maier W, Vogel T, et al. Uptake mechanism of ApoE-modified nanoparticles on brain capillary endothelial cells as a blood-brain barrier model. *PloS one*. 2012;7(3):e32568.
25. Schneider CS, Perez JG, Cheng E, Zhang C, Mastorakos P, Hanes J, et al. Minimizing the non-specific binding of nanoparticles to the brain enables active targeting of Fn14-positive glioblastoma cells. *Biomaterials*. 2015;42:42-51.
26. Qian H, Wohl AR, Crow JT, Macosko CW, Hoyer TR. A Strategy for Control of "Random" Copolymerization of Lactide and Glycolide: Application to Synthesis of PEG-b-PLGA Block Polymers Having Narrow Dispersity. *Macromolecules*. 2011;44(18):7132-40.
27. Rabanel J-M, Faivre J, F.Tehrani S, Lalloz A, Hildgen P, Banquy X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7(19):10374-85.
28. Rabanel J-M, Hildgen P, Banquy X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *Journal of Controlled Release*. 2014;185:71-87.
29. Gromnicova R, Kaya M, Romero IA, Williams P, Satchell S, Sharrack B, et al. Transport of Gold Nanoparticles by Vascular Endothelium from Different Human Tissues. *PloS one*. 2016;11(8):e0161610.
30. Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protocols*. 2007;2(9):2111-9.
31. Marrache S, Dhar S. Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(40):16288-93.

32. Logie J, Owen SC, McLaughlin CK, Shoichet MS. PEG-graft density controls polymeric nanoparticle micelle stability. *Chemistry of Materials*. 2014;26(9):2847-55.
33. Anselmo AC, Zhang M, Kumar S, Vogus DR, Menegatti S, Helgeson ME, et al. Elasticity of Nanoparticles Influences Their Blood Circulation, Phagocytosis, Endocytosis, and Targeting. *ACS nano*. 2015;9(3):3169-77.
34. Riley T, Govender T, Stolnik S, Xiong CD, Garnett MC, Illum L, et al. Colloidal stability and drug incorporation aspects of micellar-like PLA–PEG nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1999;16(1):147-59.
35. Liu X, Chen Y, Li H, Huang N, Jin Q, Ren K, et al. Enhanced retention and cellular uptake of nanoparticles in tumors by controlling their aggregation behavior. *ACS nano*. 2013;7(7):6244-57.
36. Camos S, Mallolas J. Experimental models for assaying microvascular endothelial cell pathophysiology in stroke. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2010;15(12):9104-34.
37. Brown RC, Morris AP, O'Neil RG. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain research*. 2007;1130(1):17-30.
38. Dutta D, Williamson CD, Cole NB, Donaldson JG. Pitstop 2 is a potent inhibitor of clathrin-independent endocytosis. *PloS one*. 2012;7(9):e45799.
39. Gref R, Lück M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2000;18(3–4):301-13.
40. Schöttler S, Landfester K, Mailänder V. Controlling the Stealth Effect of Nanocarriers through Understanding the Protein Corona. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016;55(31):8806-15.
41. Sacchetti C, Motamedchaboki K, Magrini A, Palmieri G, Mattei M, Bernardini S, et al. Surface polyethylene glycol conformation influences the protein corona of polyethylene glycol-modified single-walled carbon nanotubes: potential implications on biological performance. *ACS nano*. 2013;7(3):1974-89.
42. Maffre P, Brandholt S, Nienhaus K, Shang L, Parak WJ, Nienhaus GU. Effects of surface functionalization on the adsorption of human serum albumin onto nanoparticles – a fluorescence correlation spectroscopy study. *Beilstein J Nanotechnol*. 2014;5:2036-47.
43. Landgraf L, Müller I, Ernst P, Schäfer M, Rosman C, Schick I, et al. Comparative evaluation of the impact on endothelial cells induced by different nanoparticle structures and functionalization. *Beilstein J Nanotechnol*. 2015;6:300-12.
44. Halamoda-Kenzaoui B, Ceridono M, Urban P, Bogni A, Ponti J, Gioria S, et al. The agglomeration state of nanoparticles can influence the mechanism of their cellular internalisation. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):48.
45. Hervé F, Ghinea N, Scherrmann J-M. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *The AAPS journal*. 2008;10(3):455-72.
46. Pozzi D, Colapicchioni V, Caracciolo G, Piovesana S, Capriotti AL, Palchetti S, et al. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio-nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells. *Nanoscale*. 2014;6(5):2782-92.

47. Guarnieri D, Guaccio A, Fusco S, Netti PA. Effect of serum proteins on polystyrene nanoparticle uptake and intracellular trafficking in endothelial cells. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011;13(9):4295.
48. Godinho BM, Ogier JR, Quinlan A, Darcy R, Griffin BT, Cryan JF, et al. PEGylated cyclodextrins as novel siRNA nanosystems: correlations between polyethylene glycol length and nanoparticle stability. *International journal of pharmaceutics*. 2014;473(1-2):105-12.
49. Ku S, Yan F, Wang Y, Sun Y, Yang N, Ye L. The blood-brain barrier penetration and distribution of PEGylated fluorescein-doped magnetic silica nanoparticles in rat brain. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;394(4):871-6.
50. He B, Yuan L, Dai W, Gao W, Zhang H, Wang X, et al. Dynamic bio-adhesion of polymer nanoparticles on MDCK epithelial cells and its impact on bio-membranes, endocytosis and paracytosis. *Nanoscale*. 2016;8(11):6129-45.
51. Yang C, Gao S, Dagnæs-Hansen F, Jakobsen M, Kjems J. Impact of PEG Chain Length on the Physical Properties and Bioactivity of PEGylated Chitosan/siRNA Nanoparticles in Vitro and in Vivo. *ACS applied materials & interfaces*. 2017;9(14):12203-16.
52. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009;66(17):2873-96.
53. Hu X, Yang F, Liao Y, Li L, Zhang L. Cholesterol-PEG comodified poly (N-butyl) cyanoacrylate nanoparticles for brain delivery: in vitro and in vivo evaluations. *Drug Delivery*. 2017;24(1):121-32.
54. Ivask A, Pilkington EH, Blin T, Käkinen A, Vija H, Visnapuu M, et al. Uptake and transcytosis of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles in an in vitro blood brain barrier model. *Biomaterials science*. 2018;6(2):314-23.
55. Kou L, Sun J, Zhai Y, He Z. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;8(1):1-10.
56. Andreone BJ, Chow BW, Tata A, Lacoste B, Ben-Zvi A, Bullock K, et al. Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. *Neuron*. 2017;94(3):581-94.e5.
57. Ivanov AI. Pharmacological Inhibitors of Exocytosis and Endocytosis: Novel Bullets for Old Targets. In: Ivanov AI, editor. *Exocytosis and Endocytosis*. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 3-18.
58. Hsu J, Rappaport J, Muro S. Specific binding, uptake, and transport of icam-1-targeted nanocarriers across endothelial and subendothelial cell components of the blood-brain barrier. *Pharmaceutical research*. 2014;31(7):1855-66.
59. Grenier P, de Oliveira Viana IM, Lima EM, Bertrand N. Anti-polyethylene glycol antibodies alter the protein corona deposited on nanoparticles and the physiological pathways regulating their fate in vivo. *Journal of Controlled Release*. 2018;287:121-31.
60. Duncan R. Polymer therapeutics: top 10 selling pharmaceuticals—what next? *Journal of Controlled release*. 2014;190:371-80.

ANNEXE 1 : INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES ARTICLE 1

“Length of surface PEG modulates nanocarrier transcytosis across brain vascular endothelial cells”

Soudeh F. Tehrani, Florian Bernard-Patrzynski, Ina Puscas, Grégoire Leclair, Patrice Hildgen, V Gaëlle Roullin*

Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville,
Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

Chemical Procedures

Chemical materials and reagents

Dichloromethane (CH_2Cl_2) anhydrous $\geq 99.8\%$, (containing 40-150 ppm amylene as stabilizer), calcium hydride (CaH_2), benzoic acid (BZ), 3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione(lactide) (LA), mPEG-OHs (1, 2, 5, 10 kDa), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene 98% (DBU), 1-pyrenebutanol and benzyl alcohol, anhydrous, 99.8% were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Chloroform-d, 99.8 atom % D and Deuterium oxide, 99.9 atom % D containing 1% (w/w) of 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Acetone (Certified ACS) and Tetrahydrofuran, HPLC grade, $\geq 99.9\%$ were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada).

MilliQ water was obtained using a Q-Gard® 1 Purification Cartridge (Millipore Ltd., Toronto, ON, Canada). Water conductivity value was $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (at 25°C). Bovine Serum Albumin (BSA) was purchased from Multicell (Wisent, St-Bruno, Canada). Gibco™ PBS (Phosphate Buffered Saline) 10 \times , pH 7.2 was purchased from Fisher scientific (Ottawa, Canada).

Prior syntheses, all reagents were dried and purified as follows. Dichloromethane (CH_2Cl_2) was dried by distillation over calcium hydride (CaH_2). LA was purified twice by recrystallization in dry toluene and pre-dried under vacuum for 24 h. mPEG_x-OHs were dried by azeotropic distillation with toluene at atmospheric pressure and dried under vacuum overnight. DBU was dried over CaH_2 and filtered on a PTFE filter ($0.45 \mu\text{m}$, Millipore).

Diblock PLA-PEG_x polymers (X: 1, 2, 5,10 kDa)

Diblock PLA-PEG_x polymers (X: 1, 2, 5,10 kDa) were obtained by ring-opening polymerization (ROP) in presence of DBU(1). Briefly, pre-dried LA and mPEG-OHs were mixed and dried under vacuum at 50°C for 1 hour prior polymerization. LA and mPEG-OHs were then co-dissolved (according ratios mentioned in Tables S1 and S2) in 25 mL of anhydrous CH_2Cl_2 under an argon atmosphere at room temperature. DBU was added dropwise into this mixture at a ratio of 1% mol/mol relative to LA. The solution was left under moderate magnetic

stirring for 1 h at room temperature. The reaction was then stopped by adding benzoic acid (1 molar equivalent to DBU). PLA-PEG_x polymers were subsequently purified by precipitation into a mixture of methanol/water (70/30 v/v) 3 times. Due to the limited solubility of high molecular weight PEG in methanol (Table S3), this mixture was found more suitable to eliminate free PEG (Table S4). Diblock polymers were dried under vacuum. The resulting white precipitates were stored in dry conditions at -20°C until further use.

Fluorescently-labelled polymer (PLA-pyrene butanol, FLU-PLA) was similarly synthesized by using 1-pyrenebutanol as a polymerization initiator. The free fluorescent dye was removed by five consecutive precipitations in pure methanol, yielding a yellow white powder, stored in dry conditions at -20°C in the dark until further use. Benzyl ester-end capped PLA (PLA-BZ, control PLA) was similarly synthesized by initiating ROP reaction by benzyl alcohol. PLA-BZ was purified by three consecutive precipitations in pure methanol. The white product was dried under vacuum and stored in dry conditions at -20°C until further use(2).

For microscopy studies, Cy5-PLA was synthesized according to the method described by Kvach *et al.*(3) PLA was solubilized in DCM. 2 eq. of Cy5-COOH relative to the number of available OH groups on OH-g-PLA were added to the PLA solution. Subsequently, 2 eq. of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and (dimethylamino) pyridine (DMAP) were added to this mixture. This solution was kept under stirring for 24 h at 40°C. Then the PLA-Cy5 polymer was precipitated twice in MeOH and dried under vacuum.

Table S1 : Quantities used for the syntheses of PLA-PEG_x
(X: 1000, 2000, 5000 & 10000 g×mol⁻¹)

Polymer	Lactide	mPEG-OH
PLA-PEG ₁₀₀₀	3 g (0.04 mol)	0.17g (1.66×10^{-4} mol)
PLA-PEG ₂₀₀₀		0.29g (1.14×10^{-4} mol)
PLA-PEG ₅₀₀₀		0.6g (1.2×10^{-4} mol)
PLA-PEG ₁₀₀₀₀		0.7 g (6.97×10^{-5} mol)

The chemical composition of polymers was characterized by ¹H NMR analyses (Bruker Advanced 400 MHz spectrometers, Bruker, Germany) and spectra were analyzed using

TOPSPIN 3.5PL5 software. Samples were dissolved in either CDCl₃ or DMSO-d₆. Typical results are shown in Figure S1 and Table S2.

¹H NMR characterization of PLA-PEG_x (X: 1000, 2000, 5000 & 10000 g×mol⁻¹): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.5 (m, 3H, CH₃), 3.3 (s, 3H, CH₃), 3.65 (m, 2H, CH₂), 5.1 (m, 1H, CH).

¹H NMR characterization of PLA-pyrene butanol: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.5 (m, 3H, CH₃), 4.3 (m 2H, CH₂), 5.1 (m, 1H, CH), 7.7-8.1 (m, 9H, benzylic).

¹H NMR characterization of PLA-BZ: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.5 (m, 3H, CH₃), 4.7 (m 2H, CH₂), 5.1 (m, 1H, CH), 7.3 (m, 5H, benzylic).

The number-average (M_n) and weight-average (M_w) molecular weights and polydispersity indexes (PDI) of polymers were obtained by gel permeation chromatography (GPC) in tetrahydrofuran (THF). A Waters liquid chromatography system equipped with a refractive index detector, GPC columns (Styragel 5 μm, Phenomenex, USA), and Breeze II software (Waters Corp., Milford, MA) was used. THF flow rate was adjusted to 1 mL×min⁻¹ and the column temperature was set at 40 °C. The calibration curve was carried out by using linear polystyrene standards (M_w 600–400000 g×mol⁻¹). Characterization data are summarized in Table S2.

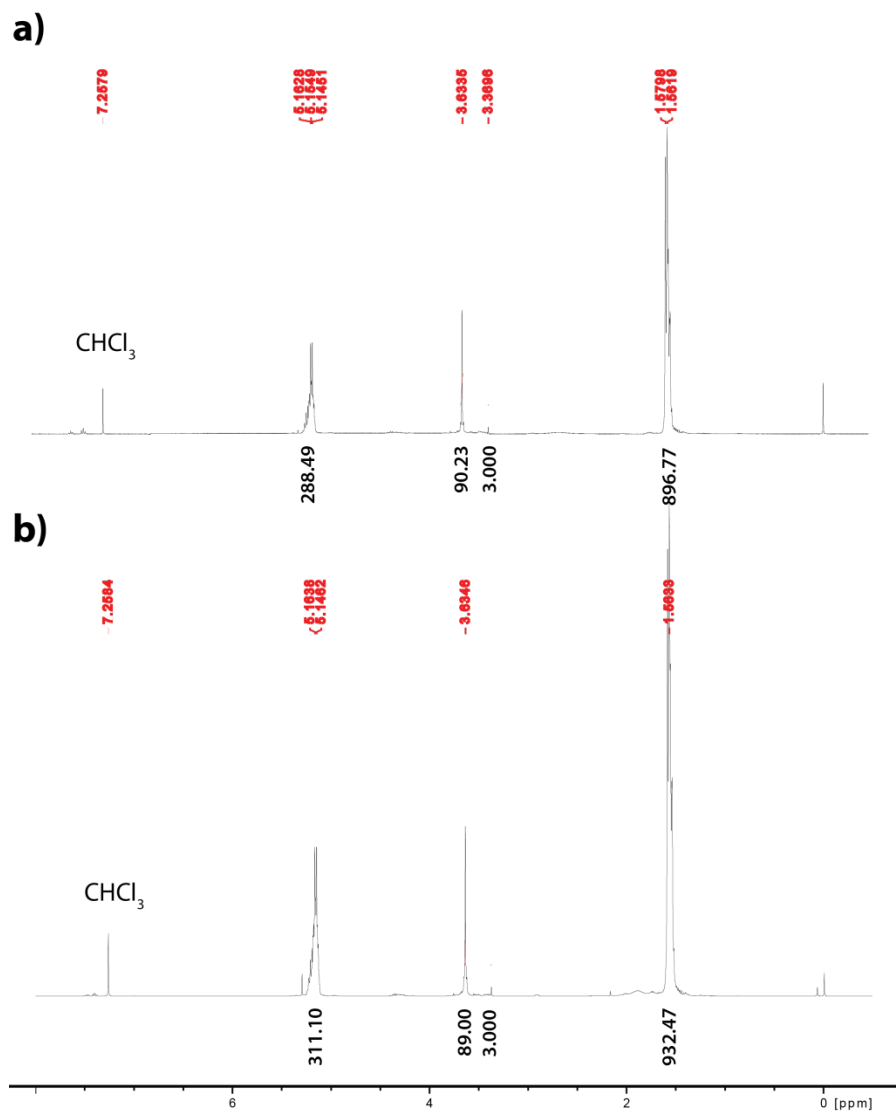


Figure S1: Typical ^1H NMR spectra of PLA-PEG₁₀₀₀ a) crude; b) after precipitation.

Table S2: Chemical ratios as well as characteristics obtained for PLA-PEG_x (X: 1000, 2000, 5000 and 10000 g×mol⁻¹)

¹ H NMR			GPC		
Batch	Status	LA : PEG mol/mol	PEG (w/w %) ^a	Mn ^c (PLA-PEG) g×mol ⁻¹	PDI
PLA-PEG ₁₀₀₀	F	250 : 1	5.26	19000	-
	C	270 : 1	5.81	17200	1.40
	P	297 : 1	4.46	22384	1.25
PLA-PEG ₂₀₀₀	F	292 : 1	8.69	23024	-
	C	285 : 1	8.88	22,520	1.18
	P	307 : 1	8.29	24104	1.25
PLA-PEG ₅₀₀₀	F	345 : 1	16.76	29840	-
	C	320 : 1	17.83	28040	1.15
	P	420 : 1	14.18	35240	1.19
PLA-PEG ₁₀₀₀₀	F	597 : 1	18.86	52980	-
	C	562 : 1	19.81	50460	1.11
	P	630 : 1	18.06	55360	1.10
		LA : Init ^b	Mn (PLA-Int) g×mol ⁻¹		PDI
PLA-BZ	F	139:1	10000		-
	P	166:1	12000		1.12
PLA-Pyrene	F	305:1	21960		-
	C	250 : 1	18000		1.08
	P	208 : 1	15000		1.06

a) PEG/PLA-PEG ratio, ^b) Init : initiator, ^c) as calculated from NMR spectra, using PEG protons as a reference
F: Feed, *i.e* expected Mn ; C: Crude, end of synthesis, prior to purification steps ; P: Purified, *i.e* after precipitation.

Polymer purification

It was noted that free PEG molecules with higher molecular weights (> 2000 g×mol⁻¹, Table S3) were difficult to remove from the reaction media with the conventional methanol extraction method (4). Free PEG could generate overestimations of PEG content and subsequently lead to the generation of non-standardized NPs. Moreover, the observed biological effects could be partially attributed to free PEG chains. Therefore, we used a mixture of MeOH:H₂O 70/30 to purify all synthesis batches for better purification efficiency (Table S4).

Table S3: Observed dissolution times of PEG in various solvents, according to PEG length.

Solute		Solvents					
PEG nature	[PEG _x] mg×mL ⁻¹	MeOH	EtOH	H ₂ O	OH:H ₂ O 70/30	OH:H ₂ O 90/10	OH:H ₂ O 90/10
PEG ₂₀₀₀	6.5	<2 min	<2 min	<2 min	<2 min	<2 min	<2 min
PEG ₅₀₀₀	6.5	Insoluble*	Insoluble*	<2 min	<3 min	<3 min	<5 min
PEG ₁₀₀₀₀	2.8	Insoluble*	Insoluble*	<5 min	<5 min	<5 min	<15 min

MeOH: pure methanol; EtOH: pure ethanol. * Vigorous magnetic stirring for 1 hour at RT (21°).

Table S4: Purification efficiencies of physical mixtures of PLA and PEG (10 and 4 equivalents) after successive steps of primary purification by precipitation (P) in MeOH^a or MeOH:H₂O 70/30^b, followed by dialysis (D) and cross flow filtration (TFF).

Free PEG _x remaining in solution at the end of the purification step (% of initial quantity, as determined by ¹ H NMR)						
	PEG _x :PLA	P1	P2	P3	P4D	TFF
^a PEG ₂₀₀₀	10:1	21.1	6.8	4.1	3.51.1	0.4
^b PEG ₅₀₀₀	10:1	10.5	4.8	3.5	2.72.4	0.5
^b PEG ₅₀₀₀	4:1	6.3	1.7	0.6	0.1nd	nd
^b PEG ₁₀₀₀₀	4:1	4.6	3.8	3.2	2.72.2	0.9

nd: not detected. D: dialysis cycle using 50 kDa dialysis membrane, 1:100 volume ratio, for 3 times 2 h at room temperature under moderate magnetic stirring. TFF: cross flow filtration cycle using 50 nm Polysulfone membrane, at a flow rate of 3 mL×min⁻¹.

Synthesis and characterization of PLA –PEG NPs

NPs were prepared by the nanoprecipitation method (5),(6), as previously reported without addition of any surfactant. Similar hydrodynamic diameters were obtained through adjustments of the polymer concentrations in the organic phase. Briefly, polymers were dissolved in acetone at concentrations varying from 10 to 35 mg×mL⁻¹ : [PLA-PEG₁₀₀₀] = 1% (w/v), [PLA-PEG₂₀₀₀] = 2.5%(w/v), [PLA-PEG₅₀₀₀] = 3% (w/v) and [PLA-PEG₁₀₀₀₀] = 3.5% (w/v). Polymer solutions were then injected in MilliQ water (volume ratio 1:3) at a constant flow rate of 1 mL×min⁻¹ under magnetic stirring. Control PLA NPs (without PEG) were

similarly obtained by dissolving PLA-BZ in acetone at $3.3 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$. Fluorescently-labelled NPs were prepared in an identical manner, by adding 10% w/w PLA-pyrene to total polymers.

NPs were purified by dialysis (Por®6 pre-wetted membrane dialysis 50 kDa, Spectrum Laboratories, USA) against a 100-fold volume of Milli-Q water for 6 h, thrice. An additional step of purification and concentration of NPs was carried out by tangential flow filtration using a polysulfone tangential filtration membrane (pore size: 50 nm, Spectrum Laboratories, USA) at a flow rate of $3.5 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$ (Table S5). NP suspensions were concentrated between 3 to 5 times and remained stable at 4°C for at least 2 weeks.

NP hydrodynamic diameters were determined by Dynamic Light Scattering (DLS) on a Malvern Zetasizer (Malvern, Worcester, UK) at a scattering angle of 173° , using Milli-Q water as a reference medium and at 25°C , unless otherwise stated. For each NP batch, data were collected as means of z-average values of three consecutive runs.

NP ζ -potential values were obtained by Electrophoretic Light Scattering (ELS) (Malvern Zetasizer, Malvern, Worcester, U.K.) by suspending $300 \text{ }\mu\text{L}$ of NPs in $900 \text{ }\mu\text{L}$ of 1 mM NaCl to obtain a near-constant conductivity (average conductivity = $0.145 \pm 0.004 \text{ mS} \times \text{cm}^{-1}$, $n > 45$). For each batch, data were collected at 25°C , as an average value of three consecutive runs.

Table S5: Typical NPs characteristics at various purification steps. n=9 (3 independent batches, 3 measurements/batch).

NP type	Purification step	D _H (nm)	PdI	ZP (mV)	Deviation (mV)
PLA	raw	185 ± 6	0.23 ± 0.02	-26.6 ± 0.9	7.8 ± 0.7
	dialyzed	116 ± 1	0.12 ± 0.01	-32.0 ± 1.9	9.0 ± 2.2
	after TFF	125 ± 1	0.11 ± 0.01	-30.4 ± 2.5	8.8 ± 1.4
PLA-PEG ₁₀₀₀	raw	138 ± 1	0.13 ± 0.03	-26.1 ± 0.4	8.3 ± 0.7
	dialyzed	102 ± 7	0.08 ± 0.02	-23.0 ± 1.1	9.9 ± 1.1
	after TFF	104 ± 3	0.13 ± 0.03	-19.3 ± 0.1	6.7 ± 1.1
PLA-PEG ₂₀₀₀	raw	114 ± 2	0.13 ± 0.03	-16.0 ± 1.3	10.0 ± 1.7
	dialyzed	101 ± 1	0.11 ± 0.03	-14.1 ± 1.1	8.7 ± 0.5
	after TFF	102 ± 2	0.11 ± 0.01	-13.2 ± 0.1	10.3 ± 1.1
PLA-PEG ₅₀₀₀	raw	113 ± 2	0.10 ± 0.04	-10.6 ± 1.7	6.8 ± 1.0
	dialyzed	103 ± 5	0.12 ± 0.03	-12.7 ± 1.0	9.7 ± 0.9
	after TFF	105 ± 1	0.09 ± 0.01	-10.9 ± 1.3	8.2 ± 1.2
PLA-PEG ₁₀₀₀₀	raw	101 ± 1	0.10 ± 0.02	-2.7 ± 0.1	7.3 ± 0.3
	dialyzed	97 ± 2	0.09 ± 0.01	-2.0 ± 0.1	7.1 ± 0.2
	after TFF	99 ± 2	0.09 ± 0.01	-6.2 ± 0.5	5.9 ± 0.9

Table S6: PEG content during the purification process of PLA-PEG NPs by dialysis and TFF, as determined by ¹H NMR.

NP type	Purification process	Initial LA: PEG _x ratio (mol:mol)	PEG _x content (w/w %)	Mn PLA-PEG _x (g×mol ⁻¹)
PLA-PEG ₁₀₀₀	Dialysis	274 :1	4.8	20730
	TFF	266 :1	5.0	20150
PLA-PEG ₂₀₀₀	Dialysis	316 :1	8.1	24750
	TFF	310 :1	8.2	24320
PLA-PEG ₅₀₀₀	Dialysis	427 :1	14.0	35744
	TFF	423 :1	14.1	35456
PLA-PEG ₁₀₀₀₀	Dialysis	634 :1	18.0	55648
	TFF	617 :1	18.4	54424

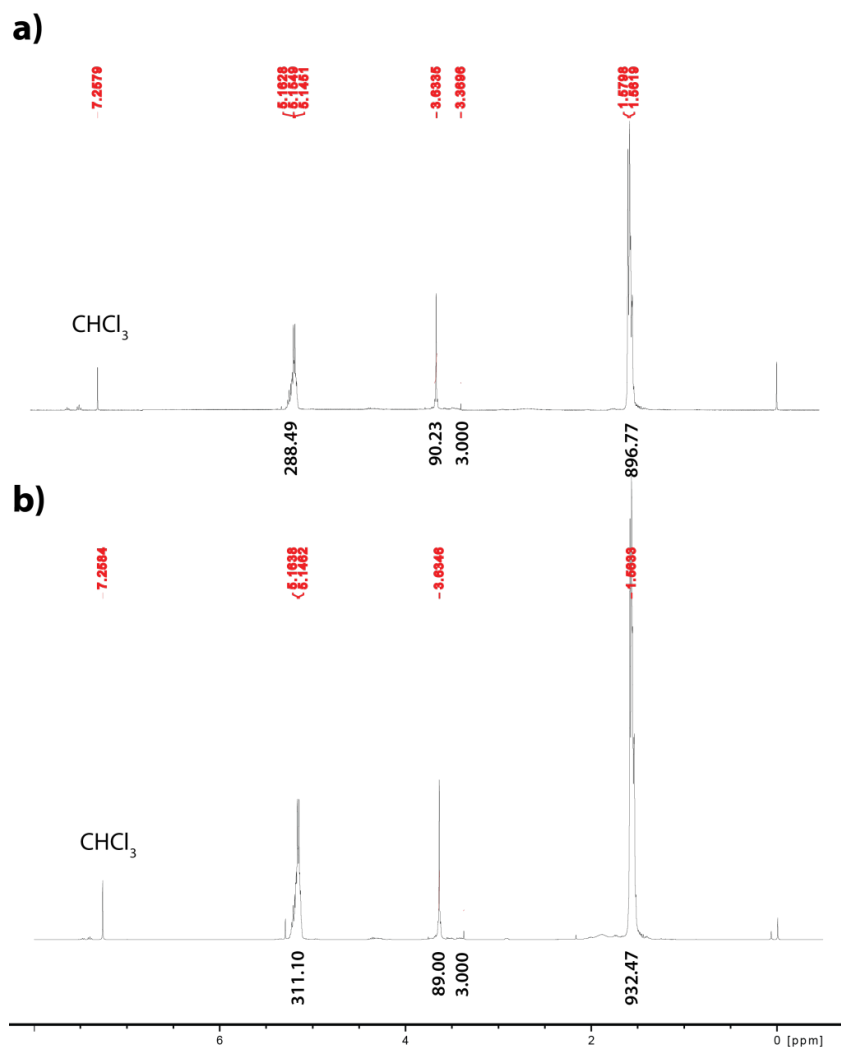


Figure S2: Typical ^1H NMR spectra of PLA-PEG₁₀₀₀ diblock polymer from NPs a) after purification by dialysis; b) after dialysis followed by TFF. NPs were solubilized in CDCl_3 at $30 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$.

Diffusion-ordered spectroscopy experiments (DOSY)

Diffusion-ordered spectroscopy experiments (DOSY) were performed to investigate the efficacy of NPs purification. DOSY experiments were carried out on a Bruker Avance 600 equipped with a Bruker Diff 30 probe, using 16-32 gradients with a gradient pulse (δ) of 1 ms, a diffusion time (Δ) of 100 ms, repetition time 5 seconds. DOSY experiences were performed

at 25°C. DOSY experiments allowed determine the ratio between free PEG and PEG attached to NPs based on their diffusion coefficient differences.

Ratio between fast diffusing PEG (free PEG) and slow diffusing PEG (PEG attached to NP surfaces) decreased with purification as expected. However, the final ratio for purified nanomaterials gave about 15% of free PEG. An overestimation of free PEG could be considered for several reasons: 1) Amounts of PEG chains associated with NPs are underestimated as some PEG chains remain inside the particle core and cannot be detected. (7), (2) Different units of repetition of PEG chain have different degree of mobility due to the chain attachment to NP surface. Thus, relaxation times vary with distance from NP surface, resulting in peak broadening and leading to underestimation of PEG chain attached to the NPs (8). This effect could also be promoted by brush PEG layer conformation, decreasing PEG chain mobility

Table S7: Diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) data

PEG _x		x=1000		x=2000		x=5000		x=10000	
Samples		Free PEG	NPs	Free PEG	NPs	Free PEG	NPs	Free PEG	NPs
Free PEG	% (% of total)	100	ND	100	ND	100	ND	100	ND
	D (m ² /s)	2.6 10 ⁻¹⁰	ND	1.5 10 ⁻¹⁰	ND	6.7 10 ⁻¹¹	ND	6.0 10 ⁻¹¹	ND
Mix NPs PLA + Free PEG	% (% of total)	100	ND	100	ND	100	ND	100	ND
	D (m ² /s)	2.5 10 ⁻¹⁰	ND	1.6 10 ⁻¹⁰	ND	8 10 ⁻¹¹	ND	6.0 10 ⁻¹¹	ND
Unpurified NPs	% (% of total)	17	83	17	83	37	63	40	60
	D (m ² /s)	1.9 10 ⁻¹⁰	5.4×10 ⁻¹²	5.0 10 ⁻¹¹	7.4 10 ⁻¹²	1.1 10 ⁻¹⁰	5.4 10 ⁻¹²	4.9 10 ⁻¹¹	7.4 10 ⁻¹²
Purified NPs	% (% of total)	ND	100	11	89	14	86	ND	100
	D (m ² /s)	ND	6.1 10 ⁻¹²	7.3 10 ⁻¹¹	7.7 10 ⁻¹²	9.5 10 ⁻¹¹	6.0 10 ⁻¹²	ND	7.7 10 ⁻¹²

ND : not detectable

x=PEG chain length: 1000 ≤ x ≤ 10000 g/mol

D : Diffusion coefficient (m²/s)

NP concentration determination

500 μL of purified NP suspensions were placed in pre-weighed Eppendorf tubes and freeze-dried for 24 h to obtain NP dry weights (ModulyoD Freeze Dryer, Thermo Scientific). The tubes were weighed again after complete drying (AT261 Delta Range[®]). NP concentration ($\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$) was calculated as follows (Equation S1):

$$\text{Equation S1} \quad [\text{NP}] = \frac{\text{weight (freeze-dried NPs) (mg)}}{\text{volume (mL)}}$$

Determination of PEG presence and surface density by ¹H NMR

The chemical compositions of polymer, as well as purification efficiencies of dialysis and TFF to remove PEG, were verified by ¹H NMR analyses by solubilizing dry NPs in CDCl_3 . A typical example of spectra is given in Figure S2. PEG weight quantifications were carried out in reference to m-PEG₂₀₀₀-OH calibration curve and the internal standard peak intensity. Total weight of NPs was obtained as previously.

Determination of PEG surface density was performed by suspending concentrated NPs in D_2O and analyzing ¹H NMR signals. Initially, ¹H PEG relaxation time signal in D_2O was determined relative to the ¹H of the internal standard (3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt). D_1 was then set at 5 s during the NMR quantitative experiments, as previously reported by Rabanel *et al.* (5). Surface PEG quantification was obtained by mixing 500 μL of a concentrated NPs suspension (concentrated by TFF, 8-12 $\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$ NPs) with 500 μL D_2O containing 1% (w/w) of 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt. NP suspensions in $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ were subsequently analyzed by ¹H NMR (AV400 Advanced, Bruker, Germany). The NMR acquisition signal included a water pre-saturation pulse sequence. All spectra were analyzed with TopSpin[®] (Bruker, Germany) and a polynomial baseline correction was applied to measure accurately the PEG signal integrations.

PEG surface density, expressed as a number of PEG chains per nm^2 of NP surface, was calculated by applying the equations below (Eq. S2 to S9) (6, 9):

Equation S2
$$R_c = \frac{D_H}{2}$$

where R_c : NP mean radius (nm), D_H : NP mean hydrodynamic diameter (nm, DLS size distribution in numbers)

Equation S3
$$V_{NP} = \frac{R_c^3}{3} \times 4 \times \pi$$

where V_{NP} is the mean volume of one nanoparticle (nm^3)

Equation S4
$$W_{NP} = \frac{V_{NP}}{10^{21}} \times \rho_P$$

where W_{NP} is the weight of a NP (g), ρ_P is the polymer volumetric mass density, $\rho_P = 1.25 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$ [5]

Equation S5
$$N = \frac{W_{total}}{W_{NP}}$$

where N is the number of NPs in suspension in the sample, W_{total} is the total weight of NPs (g) determined by gravimetry

Equation S6
$$N_{PEG} = \frac{W_{PEG}}{M_w} \times N_A$$

where N_{PEG} is the number of PEG chains in the sample; W_{PEG} : weight of PEG on the surface of NP (g, determined by NMR); M_w : Molecular weight of PEG chains ($\text{g} \times \text{mol}^{-1}$), N_A : Avogadro's number

Equation S7
$$S_{NP} = R_c^2 \times 4 \times \pi$$

where S_{NP} : is the mean surface of NPs (nm^2)

Equation S8
$$S_{total} = S_{NP} \times N$$

where S_{total} : is the mean total surface of NPs (nm^2)

Equation S9
$$\text{PEG surface density} = \frac{N_{PEG}}{S_{total} \text{ (mm}^2\text{)}}$$

where PEG surface density is expressed in $\text{PEG chain} \times \text{nm}^{-2}$.

Study of colloidal stability of nanoparticles

Study of NP colloidal by Static Multiple Light Scattering

The time-dependent light scattering was measured by Turbiscan™ LAB (Formulation Inc., Toulouse, France), a technology also referred to as Static Multiple Light Scattering. The NPs were diluted in Milli-Q water, PBS or a 3% BSA (w/v) solution in PBS. Final NP concentrations were $9,375 \text{ } \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ (concentrations equivalent to those

of blood circulation in a mouse model, assuming a 1.6-mL total blood volume for a 150- μ L injection). The colloidal stability of nanoparticles was studied over 24 h by 20-min analysis cycles at 37°C in the various media. The Turbiscan™ apparatus consists in a detection head equipped with a near-infrared light source (880 nm), scanning the 20-mL sample (placed in borosilicate glass tubes 12-mm inner diameter and 25-mm high) from top to bottom. In our case, the percentages of backscattered (BS%) or transmitted (T%) light were measured during 20 min at 30 s intervals. An increase in the backscattering intensity is generally associated with increased particle concentration and size. The rate and size of particle aggregation and the extent of syneresis could be both monitored. The Turbiscan™ stability index (TSI) was calculated according to backscattering changes by Turbisoft 2.0(10). These data were confirmed by close examination of the backscattering percentage (Δ BS%) as a function of time, during a 24-h continuous observation period.

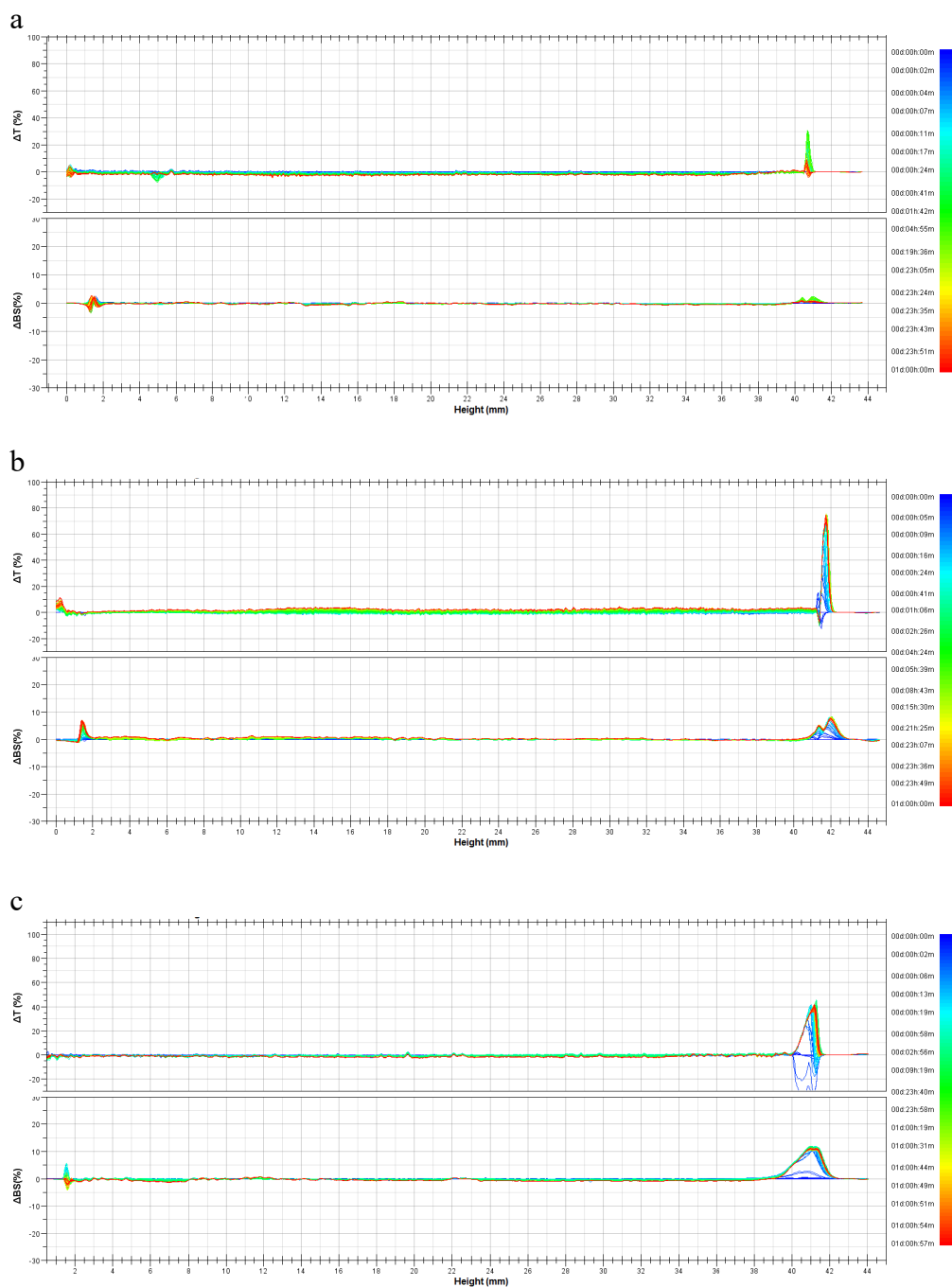


Figure S3: Raw stability data for a 24-h continuous observation. a) PLA-PEG₁₀₀₀ in PBS; b) PLA-PEG₁₀₀₀ in PBS + 3% BSA; c) PLA-PEG₅₀₀₀ in PBS + 3% BSA.

Study of NP colloidal stability by Dynamic Light Scattering

The aggregation kinetics of NPs suspensions were monitored in Milli-Q water, PBS or 3% BSA (w/v) solution in PBS by using Dynamic Light Scattering (DLS) on a Malvern Zetasizer (Malvern, Worcester, UK) at 37°C during 20 min. NPs hydrodynamic diameters and Pdl were measured immediately ($t=0$ h) and one-day later ($t=24$ h) for 20 min at 2-min intervals (three measurements of five runs at 37 °C).

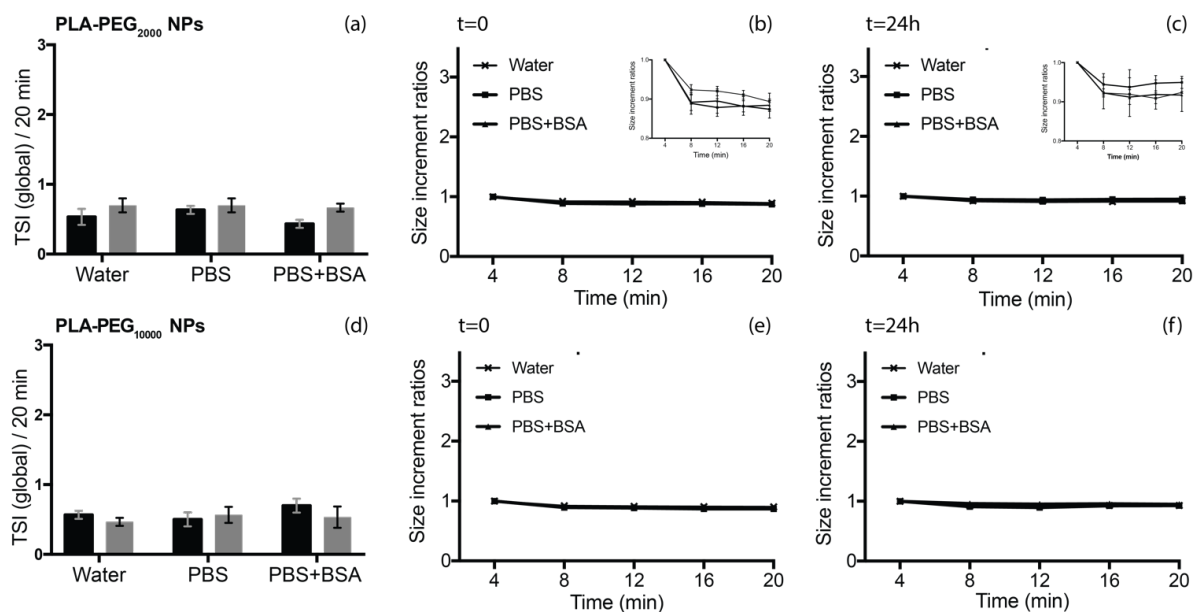


Figure S4: NP colloidal stability in various media as evidenced by the global TSI value of a) PLA-PEG₂₀₀₀ and d) PLA-PEG₁₀₀₀₀. Black bars: $t=0$ h; gray bars: $t=24$ h. $n=3$ separate experiments. Corresponding size increment ratios in the same media at $t=0$ h for b) PLA-PEG₂₀₀₀ and e) PLA-PEG₁₀₀₀₀ NPs and at $t=24$ h for c) PLA-PEG₂₀₀₀ and f) PLA-PEG₁₀₀₀₀ NPs. $n=9$ (3 measurements per batch, 3 batches).

In vitro biological assays

Biological materials and reagents

The bEnd.3 cell line (ATCC CRL-2299™) was acquired from Cedarlane (Burlington, ON, Canada) and used within the 10 first passages of the received batch. Unless otherwise stated, it was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Wisent, St-Bruno, QC Canada) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Wisent,

St-Bruno, QC, Canada) and 1× penicilline – streptomycin (ThermoFisher Scientific, Burlington, ON, Canada). Cells were maintained at 37 ± 0.5 °C under a 5% CO₂ atmosphere.

Stock solutions were freshly prepared prior each set of experiments from the following compounds: MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) at 5.0 mg×mL⁻¹ in DMEM + 10% FBS; genistein (GEN, Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) at 740 mM in DMSO (ThermoFisher Scientific, Burlington, ON, Canada); chlorpromazine (CPZ, Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) at 25 mg×mL⁻¹ in DMSO; Pitstop 2™ (PS2, Abcam®, Toronto, ON, Canada) at 5 mM in DMSO; 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA, Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) at 200 mM in DMSO. All solutions were kept as 1-mL aliquots at -20°C until further use. PBS was purchased from Wisent (St-Bruno, QC Canada).

Table S8: References of plates and equipment used for biological studies

Assay	Plate type	Manufacturer	Product #
MTT	96-well	Corning®	3997
		Corning®	3595
Endocytosis	24-well	Corning®	353847
		Corning®	3526
	12-well	Corning®	353043
		Corning®	3513
Transcytosis	24-well HTS Transwell®, polycarbonate membrane 0.33 cm ² ; porosity: 0.4 µm	Corning®	3413
Fluorescence microscopy	No. 1.5 Coverslip, 14 mm Glass Diameter, Poly-D-Lysine Coated 35 mm Dishes	MatTek Corp.	P35GC-1.5-14-C

Assay	Equipment type	Manufacturer
Spectro(fluoro)photometry	Microplate reader Safire	Tecan, Morrisville, NC, USA
Centrifugation	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Mississauga, ON, Canada
Sonication	Sonic Dismembrator model 500	Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada
Flow Cytometry	BD LSR II	BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada

Cell viability assays

Cell viability was determined by MTT assay. bEnd.3 cells were seeded at a density of 5×10^3 cells / well in 96-well plates and left overnight to adhere. Next day, medium was removed and replaced with a freshly prepared one (DMEM \pm 10% FBS) containing PLA or PLA-PEG nanoparticles, at concentrations ranging from 0.01 to 1 $\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$ (100 μL /well, $n=6$ wells per condition). Untreated cells were used as controls. After 48 h, a conventional MTT assay was performed (100 μL of MTT, 0.5 $\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$, 4 h, 37°C). After removing all media, 100 μL of DMSO were added to each well to solubilize the formazan crystals. Spectrophotometric absorbance of each sample was then measured at 560 nm.

Similarly, the MTT assay was also performed on bEnd.3 cell monolayers in presence of the following uptake inhibitors: GEN (200 μM), CPZ (3.14 μM), PS2 (20 μM) or EIPA (100 μM) (11),(12),(13). Untreated cells were used as controls. Cells were left in contact with the inhibitors for 24 h. The MTT assay was then completed in the same manner as abovementioned.

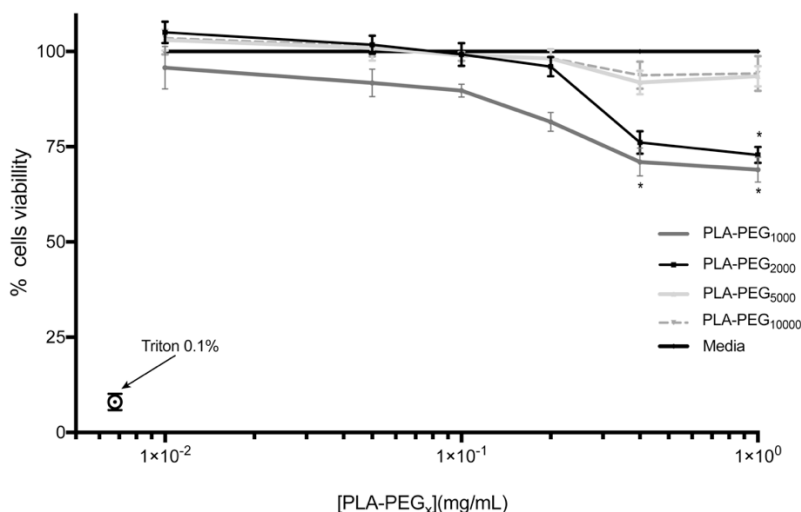


Figure S5: Percentage of viable bEnd.3 cells exposed to various PLA-PEG_x NPs as a function of NP concentration. Incubation time was 48 h in serum-supplemented medium. Means \pm SD of 6 replicates. 0.1% Triton-X-100 was used as positive control.

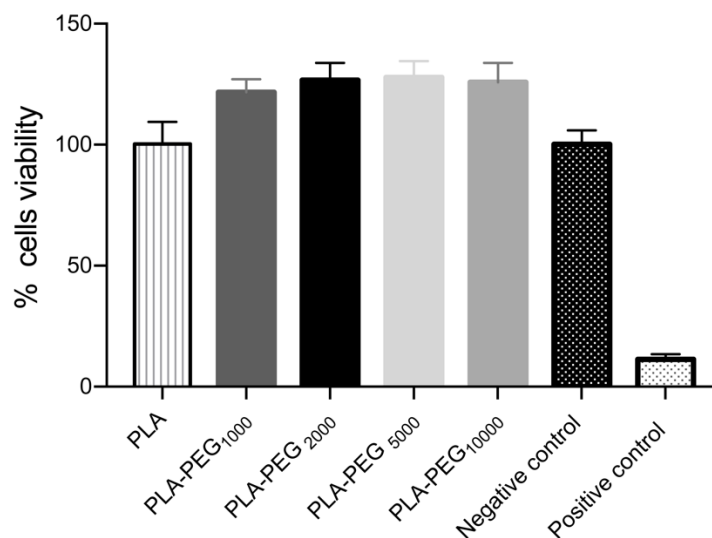


Figure S6: Percentage of viable bEnd.3 cells exposed to 200 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ PLA-PEG NPs. Incubation time was 24 h in serum-free medium. Means \pm SD of 6 replicates. Untreated cells were used as controls negative. 0.1% Triton-X-100 was used as positive control.

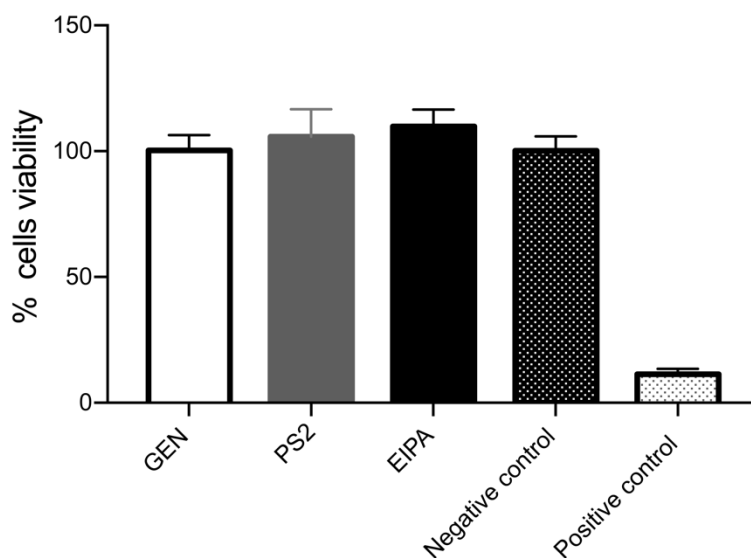


Figure S7: Percentage of viable bEnd.3 cells exposed to the various uptake inhibitors for 24 h, in serum-free medium. Means \pm SD of 6 replicates. Untreated cells were used as controls negative. 0.1% Triton-X-100 was used as positive control.

ZP measured in culture media

The ZP was measured in culture medium (DMEM) for each NP batch. The zeta potential slightly increases by enhanced shielding effect of the PEG chains for longer PEG

chains, whereas the zeta potential variability (Zeta Deviation) showed non-significant differences between NP batches in culture medium. These obtained results demonstrate that in culture medium, surface charges are screened by dissolved salts.

Table S9: ZP measured in culture medium

NP type	ZP (mV)	Zeta Deviation
PLA-PEG ₁₀₀₀	-15 ± 2	8 ± 3
PLA-PEG ₂₀₀₀	-11 ± 1	7 ± 1
PLA-PEG ₅₀₀₀	-7 ± 1	5 ± 1
PLA-PEG ₁₀₀₀₀	-5 ± 1	8 ± 1

Endocytosis assays

bEnd.3 cells were seeded at a density of 1.9×10^5 cells / well in 24-well plates and left overnight to adhere. On day 1, medium was replaced by Opti-MEM™ containing FLU-PLA or FLU-PLA-PEG_x nanoparticles to reach a final concentration of $100 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ per well (n=4 wells per condition). Wells without cells were used as controls. Cells were incubated for 3 h, prior collecting all incubation and washing media (500 μL of Opti-MEM™ supplemented with 10% FBS per well, three times plus 500 μL of PBS, per well). Cells were then trypsinized, centrifuged (800 rcf, 8 min), counted and resuspended in Opti-MEM™ to a final density of 20-25000 cells $\times\text{mL}^{-1}$. 300 μL of these cell suspensions were submitted to a 20-s sonication (power 61 %), then centrifuged at 10000 rcf during 2 min to separate cell debris from cytosol, solubilized organelles and biomolecules. Fluorescently-labelled NPs which had been uptaken by cells were retrieved in the supernatants.

Absorbances of incubation media, washing media and supernatants of lyzed cells were then measured by spectrofluorometry (excitation/emission: 344/379 nm, gain 80). For each NP type, a calibration curve was established from 0.2 to 200 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, using a matrix consistent with the corresponding experimental settings. R^2 was found > 0.99 for all calibration curves.

Washing media were quantified separately. The first washing media contained between 2 and 8% of the deposited NP quantities. The two following washing media

contained less than 1% of the deposited NP quantities. Finally, PBS washing media contained no detectable amounts of fluorescence.

The direct quantification of endocytosis rate is shown in Figure 3. The indirect quantification of endocytosis rate is displayed in Figure S8.

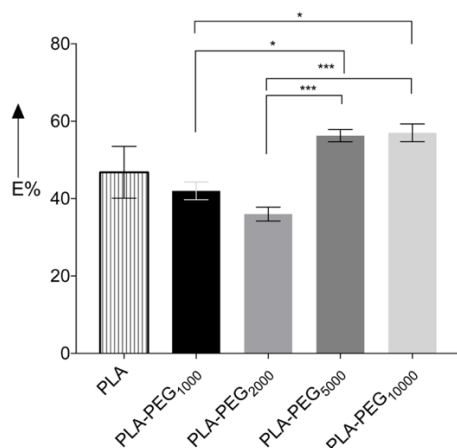


Figure S8: Endocytosis rates (E%) as measured by the indirect method after a 3-h incubation. Results are the means \pm SD of 4 separate incubations. * = $0.01 < p < 0.05$, ** = $0.001 < p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

To explore endocytosis mechanisms, bEnd.3 cells were seeded at a density of 5.4×10^4 cells / well in 12-well plates and left overnight to adhere. On day 1, medium was replaced by Opti-MEM™ solutions containing either GEN (200 μ M), CPZ (3.14 μ M), PS2 (20 μ M) or EIPA (100 μ M). (11, 13) After a 30-min incubation, media were replaced by the same inhibition media complemented with FLU-PLA-PEG₂₀₀₀ or FLU-PLA-PEG₁₀₀₀₀ nanoparticles, at a concentration of $100 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ (n=3 wells per condition). Cells treated only with NPs served as controls (n=3 wells). Cells were subsequently incubated for 3 h, prior collecting all incubation media and washing media (500 μ L of Opti-MEM™ +10% FBS per well, three times, plus 500 μ L of PBS).

Flow cytometry (FACS) analysis

Cells incubated for 3 h with the various NPs, as above-mentioned, were trypsinized, centrifuged (800 rcf, 8 min), counted and resuspended in Opti-MEM™ to a final known

density of 20-25000 cells \times mL⁻¹. Cells were then analyzed by flow cytometry, as previously reported (2). For all experiments, excitation used the 355-nm ion laser and the fluorescence band pass channel of 405/20. For each sample, 10000 cells were analyzed. Data were collected and processed using FlowJo software (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA). However, flow cytometry is a less adequate technique to evaluate the internalization of PEGylated NPs tagged with fluorescent pyrene butanol. The fluorescence intensity of pyrene varied depending on PEG chain length corona on surface of NPs. This variation in fluorescence intensity was noticed whilst establishing the calibration curves: the same concentration of NPs (tagged with 10% pyrene butanol) produced significantly different fluorescence intensities.

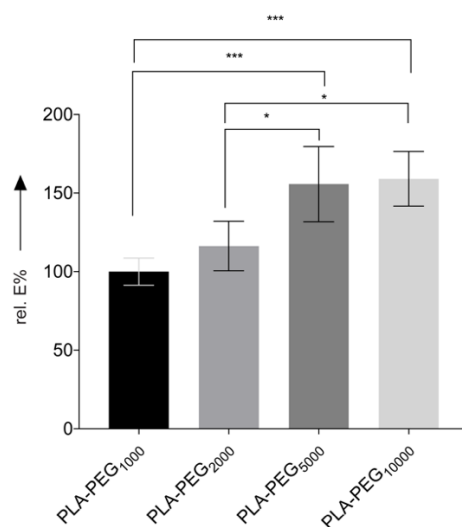


Figure S9: FACS analysis: relative endocytosis rates vs control (PLA-PEG₁₀₀₀ NPs). PLA-PEG₁₀₀₀ NPs endocytosis was set at 100 %. Endocytosis rates for other formulations are expressed as relative endocytosis rates compared to control (rel. %E). Results are the means \pm SD of 3 separate incubations. * = 0.01 < p < 0.05, ** = 0.001 < p < 0.01, ***p < 0.001

The experiments of energy-dependent endocytosis were carried out by pre-incubating the cells at 4°C for 30 min, and then incubating the cells with NPs (100 μ g \times mL⁻¹, n=3) for 2 h at 4°C. The cells treated for 2 h with NPs at 37°C were used as reference.

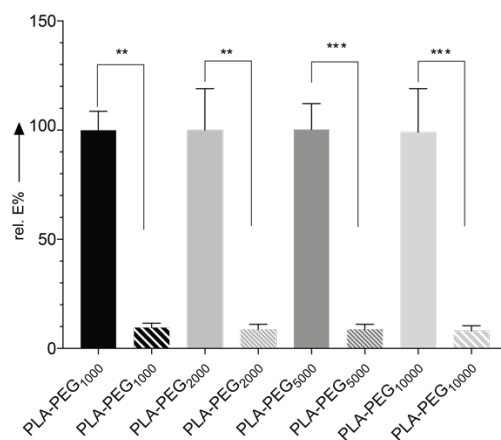


Figure S10: Inhibition of NP endocytosis at 4°C. Data expressed as relative endocytosis rate compared to 37°C uptake experiments. See material and method for experimental details.

Fluorescence microscopy

bEnd.3 cells were seeded on μ -Slide VI0.4 (ibiTreat, ibidi, Madison, WS, USA) at a concentration of 7×10^5 cells/mL (30 μ L/well). After 24 h, medium was removed and cells washed with PBS. Then Cy5-PLA-PEG_X (X= 1 to 10 kDa) at a concentration of 100 μ g/mL in Extreme DMEM (390-000-CL, Wisent, QC, Canada) were added. After a 3-h or 24-h incubation, cells were washed 3 consecutive times with medium containing 10 % FBS (to remove possible NPs bound to cell external membranes) then once with PBS. LysoTracker™ Yellow HCK-123 (L12491, ThermoFisher, ON, Canada) was thereafter added at 50 nM for 1 h (37°C). The medium was removed and cells were washed with PBS. Cells were then incubated 10 min at -20°C with pre-cold methanol (2 mL). Finally, methanol was removed and ProLong antifade mounting medium (20 μ L) containing DAPI (P36962, ThermoFisher, ON, Canada) was added. Cells were observed with a fluorescence microscope (Axio Observer, Carl Zeiss Microscopy, ON, Canada) equipped with a AxioCam MR R3 camera (Carl Zeiss Microscopy) and fluorescent illuminators X-Cite 120LEDmini (Excelitas Technologies). Images were acquired and processed with the ZEN 2.5 software (blue Edition) (Carl Zeiss Microscopy).

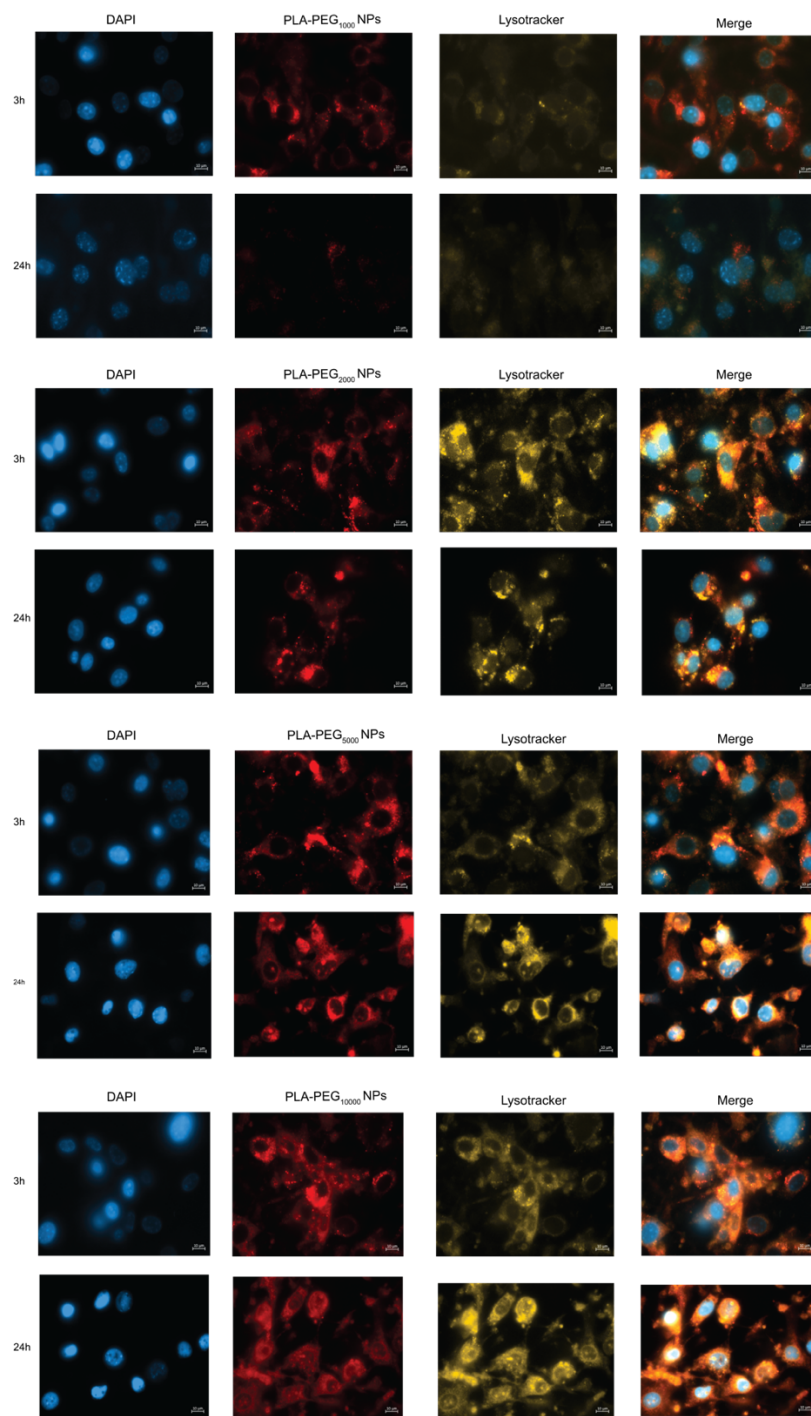


Figure S11: Merged fluorescence images of NP endocytosis in bEnd.3 cells. For each NP type: images at 3-h and 24-h post-incubation with Cy5-PLA-PEG_x NPs (red). Nuclei were labelled with DAPI (blue), whereas endosomes and intracellular vesicles were stained with LysoTracker HCK-123 (Yellow). The orange color results from the co-localization of NPs and intracellular vesicles. NPs are mainly located in the vicinity of the nuclei.

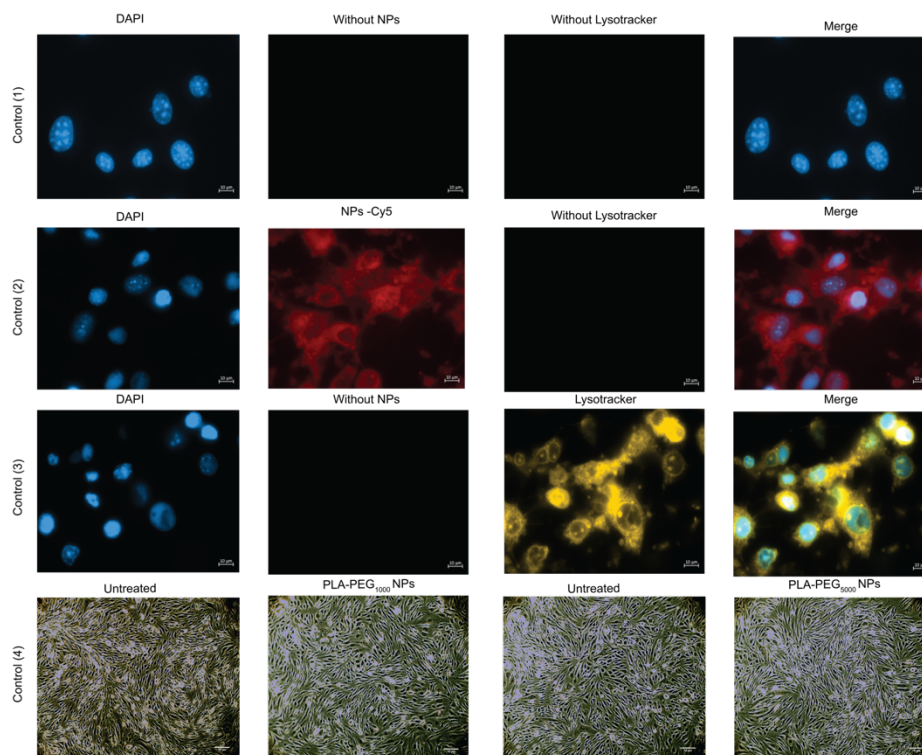


Figure S12: Labelling controls. Control (1): cell autofluorescence in the Cy5 fluorescence channel; Control (2): NP-Cy5 without LysoTracker; Control (3): cells without NPs; Control (4): Phase contrast images of bEnd.3 untreated and NP-treated cells. The cell morphology was not affected by 24-h incubation with NPs.

Transcytosis assays

bEnd.3 cells were seeded at a density of 5×10^3 cells / well in 24-well HTS Transwell® plates and left 2 days to establish a confluent and impermeable cell monolayer (TEER stable and $\geq 35\Omega\cdot\text{cm}^2$ for $A=0.33\text{cm}^2$) (Figure S13). TEER values were in accordance with literature data for confluent and impermeable bEnd.3 monolayer(14). On day 3, all media were removed. The receiver compartments were filled with 600 μL of Opti-MEM™. The donor compartments were filled with 100 μL of Opti-MEM™ containing FLU-PLA or FLU-PLA-PEG_x nanoparticles, at a concentration of $200 \mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ (n=4 wells per condition). Untreated cells were used as controls. A separate plate containing no cells served as a negative control for NP translocation and was used at the same NP concentrations. Cells were then incubated for 3 h, prior collecting all incubation and washing media (500 μL of Opti-MEM™ +10% FBS per well, three times, plus 500 μL of PBS). The same treatment procedure was then repeated and the cells were incubated 24 h with NPs, prior collecting all incubation and washing media (500 μL of Opti-MEM™

+10% FBS per well, three times, plus 500 μ L of PBS). Absorbances of all media were then measured by spectrofluorometry as previously described.

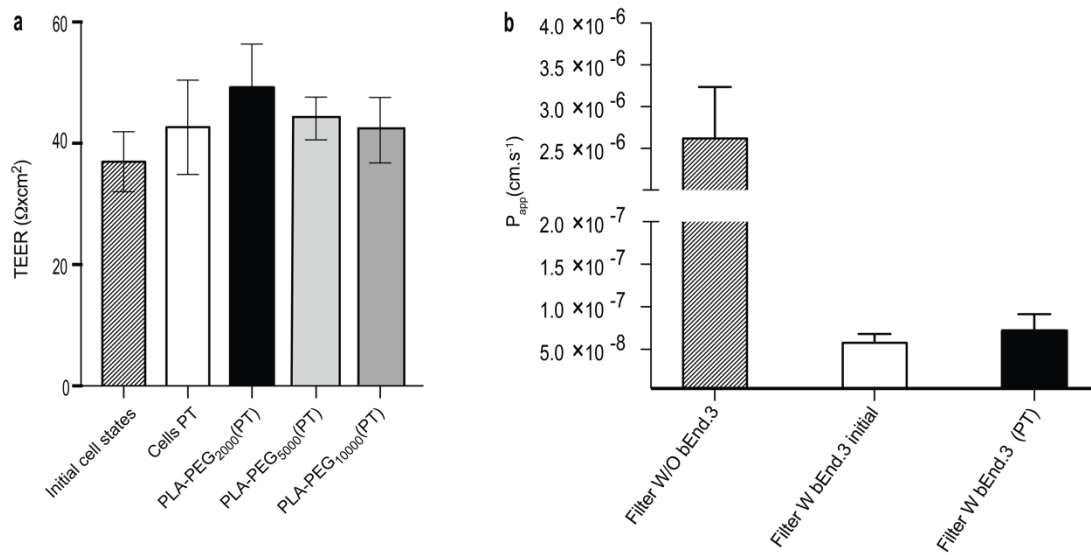


Figure S13: bEnd.3 monolayer properties. (a) TEER and (b) permeability values of FITC-dextran (150 kDa). See material and methods for experimental details. PT: post-transcytosis experiments.

The translocation efficiencies for all PEGylated NPs were compared, at the same concentrations, on Transwell® membranes with or without bEnd.3 cell monolayers during 3h and 24h (Figure S14).

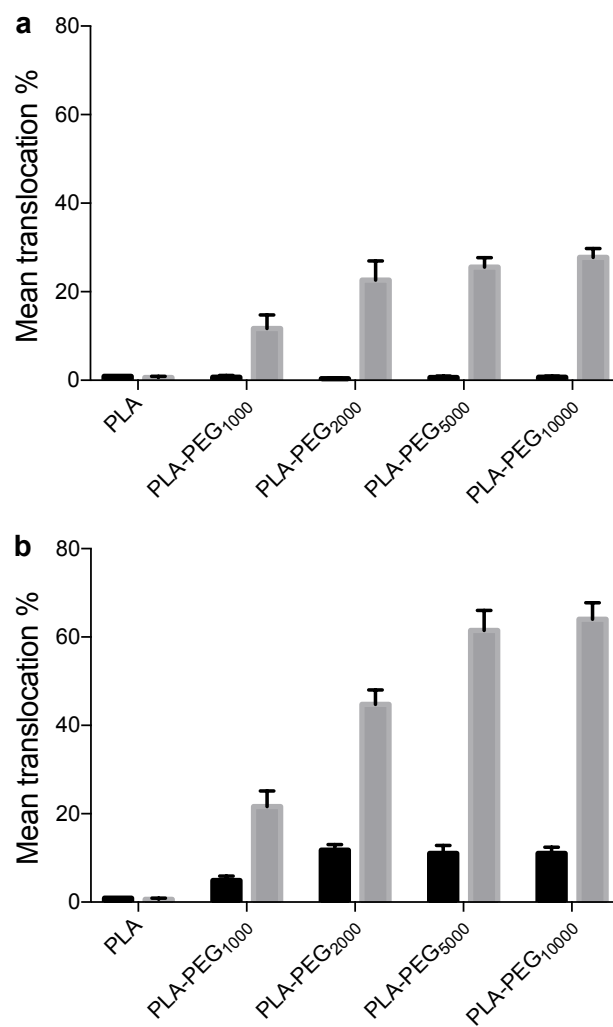


Figure S14: NP transcytosis after a) 3-h incubation; b) 24-h incubation, in absence (black bars) or in presence (grey bars) of cell monolayers on the surface of Transwell® membranes.

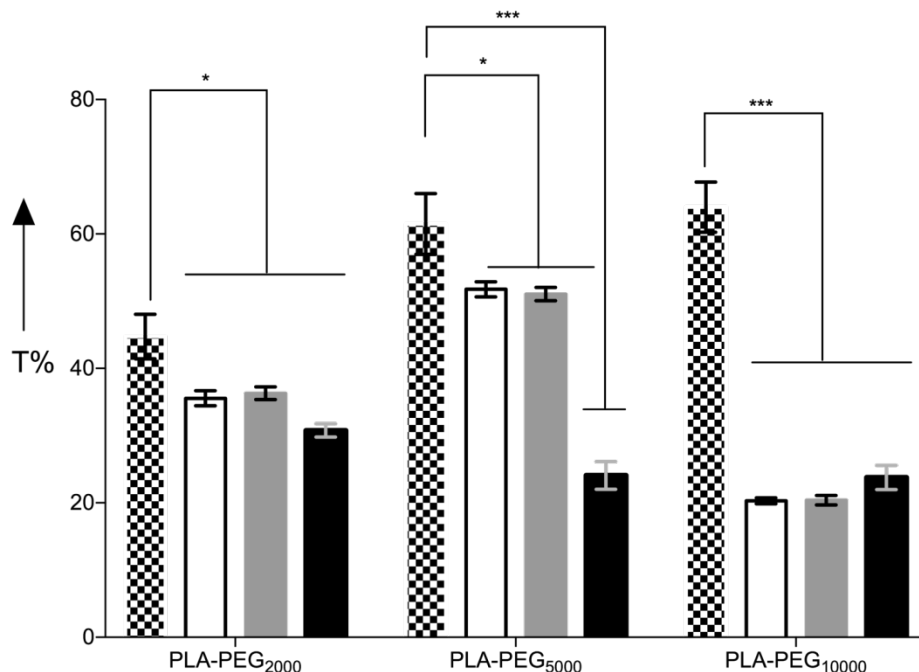


Figure S15: Transcytosis data after 24-h incubation, in presence of various cellular uptake inhibitors. Black-and-white squared bars: control, without inhibitor; white bars: GEN; grey bars: PS2; black bars: EIPA. * = $0.01 < p < 0.05$, ** = $0.001 < p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Statistical analysis

Statistics were performed by using IBM® SPSS® Statistics 24.

Statistical analysis of endocytosis data: two underlying assumptions of the ANOVA test were verified: (i) the normality of data distribution; (ii) the homoscedasticity of all data sub-groups. The normality of data distribution was confirmed by Q-Q plots. However both Levene's test and Brown-Forsythe's test ($\alpha = 0.05$) rejected the homoscedasticity between all groups by the significance p -value of 0.001 and 0.009, respectively. Welch's t-test (or unequal variances t- test) was then performed and confirmed the significance of differences between mean values with $p=0.001$, $\alpha = 0.05$. Multiple comparison procedures of Tukey test and Scheffé test ($\alpha = 0.05$) were then applied to identify the sample means that were significantly different from each other.

Statistical analysis of transcytosis data at 3h and 24h: the normality of data distribution was confirmed by Q-Q plots and Levene's test was performed ($\alpha = 0.05$). The hypothesis of homoscedasticity between variances of all groups was not rejected (p -value = 0.049 and 0.696 for 3 and 24 h respectively). The result of ANOVA test showed a

statistically significant difference ($p\text{-value} < 0.01$, $\alpha = 0.05$) between the four groups (PLA-PEG₁₀₀₀, PLA-PEG₂₀₀₀, PLA-PEG₅₀₀₀ & PLA-PEG₁₀₀₀₀) for both time points. Tukey and Scheffé tests ($\alpha = 0.05$) were then applied to identify which pairs of means were significantly different.

Statistical analysis of Papp data: Similarly, the normality of data distribution was confirmed by Q-Q plot ($p\text{-value}_{3h} = 0.4744$, $p\text{-value}_{24h} = 0.1509$). The results of the ANOVA test confirmed statistically significant differences between all groups ($p\text{-value} < 0.01$ for 3 and 24h, respectively). Then, multiple comparison procedures of Tukey and Scheffé tests were applied to identify which pairs of means were significantly different.

Statistical analysis of the transcytosis mechanism experiences: Data were analyzed as three groups: PLA-PEG₂₀₀₀, PLA-PEG₅₀₀₀ & PLA-PEG₁₀₀₀₀. The inhibitor effects were first studied for each group. The normality of data distribution was confirmed by Q-Q plots and the hypothesis of homoscedasticity between variances of the groups was not rejected (Levene's test : $p\text{-value} = 0.150$, $\alpha = 0.05$). A statistically significant difference between the three groups (PLA-PEG₂₀₀₀, PLA-PEG₅₀₀₀ & PLA-PEG₁₀₀₀₀) was confirmed (ANOVA test: $p\text{-value} = 0.008$, $\alpha = 0.05$). The statistically significant differences between pairs of means were then calculated using Tukey and Scheffé tests ($\alpha = 0.05$).

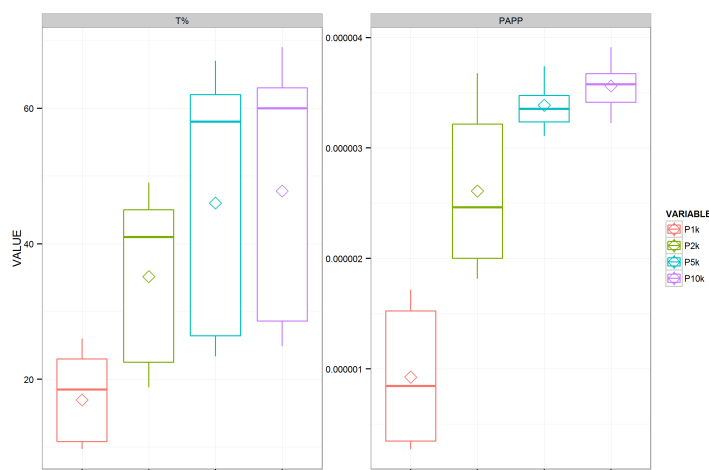


Figure S16: Boxplot of transcytosis rates and Papp and their corresponding means (diamonds) for four NPs with different PEG lengths (1, 2, 5, and 10 kDa).

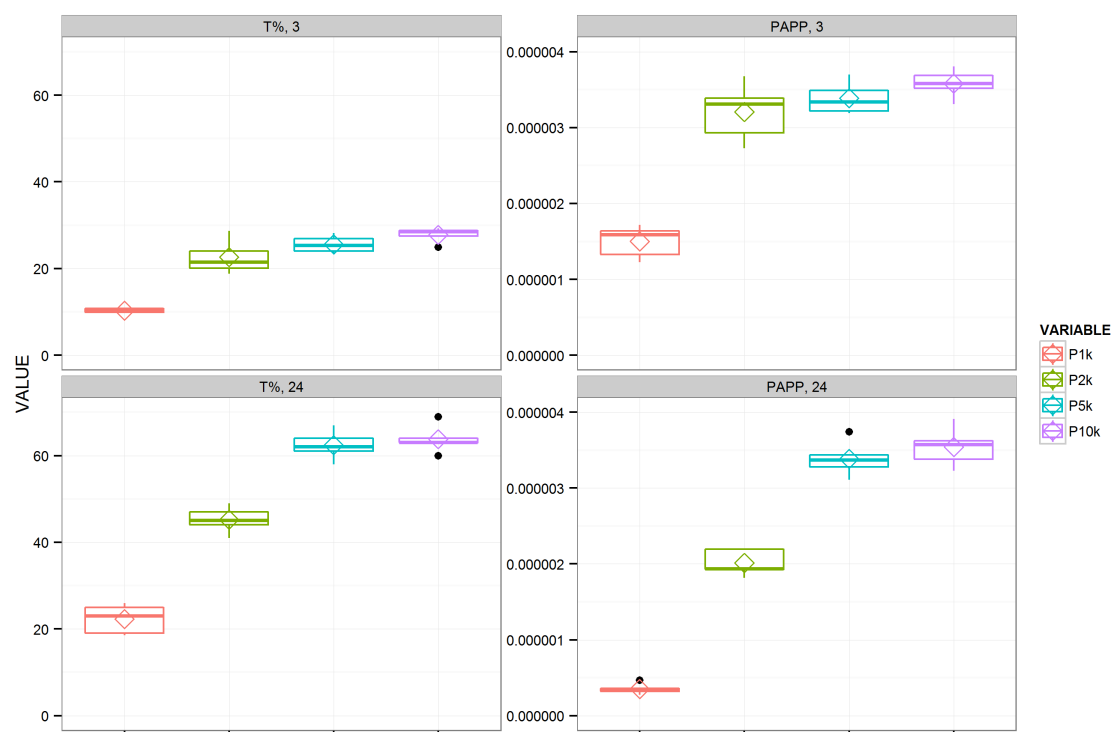


Figure S17: Boxplot of evolution of transcytosis rates and Papp at 3 and 24 hours with their corresponding means (diamonds) for four NPs with different PEG lengths (1, 2, 5, and 10 kDa).

References Annexe 1

1. Qian H, Wohl AR, Crow JT, Macosko CW, Hoyer TR. A strategy for control of “random” copolymerization of lactide and glycolide: application to synthesis of PEG-b-PLGA block polymers having narrow dispersity. *Macromolecules*. 2011;44(18):7132-40.
2. Nguyen CA, Allemann E, Schwach G, Doelker E, Gurny R. Synthesis of a novel fluorescent poly(D,L-lactide) end-capped with 1-pyrenebutanol used for the preparation of nanoparticles. *Eur J Pharm Sci*. 2003;20(2):217-22.
3. Kvach MV, Ustinov AV, Stepanova IA, Malakhov AD, Skorobogatyi MV, Shmanai VV, et al. A convenient synthesis of cyanine dyes: reagents for the labeling of biomolecules. *European Journal of Organic Chemistry*. 2008;2008(12):2107-17.
4. Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*. 2007;28(5):869-76.
5. Rigaux G, Roullin VG, Cadiou C, Portefaix C, Gulick LV, Bœuf G, et al. A new magnetic resonance imaging contrast agent loaded into poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for long-term detection of tumors. *Nanotechnology*. 2014;25(44):445103.
6. Rabanel J-M, Hildgen P, Banquy X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *Journal of Controlled Release*. 2014;185:71-87.
7. Rabanel J-M, Faivre J, F. Tehrani S, Lalloz A, Hildgen P, Banquy X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7(19):10374-85.
8. Hrkach JS, Peracchia MT, Bomb A, Lotan n, Langer R. Nanotechnology for biomaterials engineering: structural characterization of amphiphilic polymeric nanoparticles by 1H NMR spectroscopy. *Biomaterials*. 1997;18(1):27-30.
9. Perry JL, Reuter KG, Kai MP, Herlihy KP, Jones SW, Luft JC, et al. PEGylated PRINT nanoparticles: the impact of PEG density on protein binding, macrophage association, biodistribution, and pharmacokinetics. *Nano Lett*. 2012;12(10):5304-10.
10. Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, Fresta M. Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;72(1):155-60.
11. dos Santos T, Varela J, Lynch I, Salvati A, Dawson KA. Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines. *PLoS One*. 2011;6(9):e24438.
12. Viricel W, Poirier S, Mbarek A, Derbali R, Mayer G, Leblond J. Cationic switchable lipids: pH-triggered molecular switch for siRNA delivery. *Nanoscale*. 2017;9(1):31-6.
13. Gromnicova R, Kaya M, Romero IA, Williams P, Satchell S, Sharrack B, et al. Transport of gold nanoparticles by vascular endothelium from different human tissues. *PloS one*. 2016;11(8):e0161610.
14. Yang S, Mei S, Jin H, Zhu B, Tian Y, Huo J, et al. Identification of two immortalized cell lines, ECV304 and bEnd3, for in vitro permeability studies of blood-brain barrier. *PloS one*. 2017;12(10):e0187017.

4 Article 2 “PEG length of PLA-PEG nanoparticles modulates nanoparticle interactions with endothelial cells: effects on inflammatory responses and ROS production”

Soudeh F. Tehrani^{1,2}, Samuel Legeay², Jean-Michel Rabanel⁴, Jérôme Cayon³, Jérémie Riou², Patrick Saulnier², Sylvie Marleau¹, V. Gaëlle Roullin¹, Patrice Hildgen¹, Guillaume Bastiat²

¹ *Faculty of pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville Montréal (Québec), H3C 3J7, Canada*

² *Micro & Nanomédecines Translationnelles-MINT, UNIV Angers, INSERM U1066, CNRS UMR 6021, Angers, France.*

³ *PACeM : Plateforme d'Analyse Cellulaire et Moléculaire (PACeM, SFR ICAT 4208) UNIV Angers, Angers, France.*

⁴ *INRS Institut Armand-Frappier, 531 Boul des Prairies, Laval (Québec), H7V 1B7, Canada*

Article soumis à «Molecular Pharmaceutics »le 28 Août 2019

Article 2 : Résumé

Les nanoparticules polymère (NP) sont largement testées pour l'administration de principes actifs et d'agents d'imagerie au cerveau. Malgré des recherches intensives sur les systèmes d'administration de médicaments basés sur les nanotechnologies, leur profil toxicologique reste à évaluer, notamment, les effets du nanovecteur sur les processus inflammatoires ont été encore très peu étudiés. Les propriétés de surface des NP pourraient considérablement influencer la toxicité et la réponse inflammatoire des cellules exposées aux NPs.

Les NP polymériques étudiées ici présentent une structure cœur-couronne. Le cœur de NPs est constitué d'un bloc hydrophobe de poly (acide lactique) (PLA) et la surface est composée d'une couronne hydrophile de polyéthylène glycol (PEG). L'effet de la longueur de la chaîne de PEG à la surface des NPs sur l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire a été étudié dans deux lignées de cellules endothéliales vasculaires (bEnd.3 et HUVEC) par qPCR. De plus, la génération de ROS par NPs a été évaluée avec des dosages DCFH-DA.

Les résultats ont montré que les NP PEGylées induisent une activation légère et transitoire des gènes de cytokines et de chimiokines inflammatoires. Des réponses inflammatoires significatives ont été observées pour des longueurs de chaîne de PEG plus longues. Cependant, la longueur des chaînes de PEG ne présente pas un effet significatif sur l'expression des gènes des cytokines et des chimiokines. De plus, nos résultats ne montrent pas l'induction de la génération de ROS par les NPs PEGylées.

4.1 Abstract

Polymer nanoparticles (NPs) are extensively studied as drug delivery systems for various therapeutic indications, including drug and imaging agent delivery to the brain. Despite intensive research on nano-based drug delivery systems, their toxicological profile has yet to be fully characterized. In particular, the more subtle effects of nanomaterials on inflammatory processes have scarcely been investigated.

Surface properties of NPs are amongst parameters governing interactions between living cells and NPs. They could considerably influence the toxicity and inflammatory response of the cells exposed to NPs.

Polymeric NPs investigated here present a core-shell structure. The core is constituted of hydrophobic Poly(lactic acid) (PLA) block and the surface is composed of a shell of hydrophilic block of Polyethylene glycol (PEG). The effect of PEG chain length coating on the expression of genes involved in the inflammation response was investigated in two vascular endothelial cell lines (bEnd.3 and HUVEC) by qPCR. Moreover, ROS generation following NP uptake was evaluated with DCFH-DA assays.

The results showed that PEGylated NPs induce a mild and transient activation of inflammatory cytokine and chemokine genes. Significant responses were observed for longer PEG chain lengths. However, differences in PEG chain length did not show significant effect on cytokine and chemokine gene expression. PEGylated NPs did not trigger ROS generation.

Keywords: PEG-PLA nanoparticle; bEnd.3; HUVEC; ROS; cytokine; chemokine.

4.2 Introduction

Polymer nanoparticles (NPs) are extensively studied for brain delivery strategies of drugs and imaging agents (1). A number of studies have shown that NPs could improve drug efficacy by enhancing brain tissue penetration (2). NPs could also decrease drug toxicity by limiting peripheral side effects. Moreover, NPs developed for the treatment of

cancer or chronic brain disease are generally administered as repeated intravenous injections. Therefore, the potential toxicity of the NP drug delivery system itself should constitute a primary concern during the development of a new nanoformulation. NPs must not induce toxic effects on cells with which they come into direct contact, such as vascular endothelial cells (3), macrophages (4), cells comprising filtration organs (5) and finally targeted cells. Therefore, in-depth investigation of the NP's effect on the inflammatory response in different cell lines, particularly in vascular endothelial cells (VECs), is crucial. Yet, the inflammation and immune responses of VECs in contact with polymeric NPs are seldom reported and little information on the subject is currently available.

Brain microvascular endothelial cells play a crucial role in the blood-brain barrier (BBB) functions. Due to its selective permeability, the BBB protects the brain against pathogens and other toxic chemicals, thereby maintaining brain homeostasis. The BBB is particularly sensitive to different types of insults by pathogens or foreign materials, inducing inflammatory responses. Inflammation can trigger numerous biological alterations of the endothelium, including secretion of pro-inflammatory mediators (6), up-regulation of adhesion molecules as well as pro-coagulant activity (7). These endothelial dysfunctions could lead to the modulation of BBB permeability (8) which, in turn, may alter brain homeostasis as well as brain disease progression (9).

As any foreign material introduced in the bloodstream, NPs could elicit different biological responses including inflammation. Rational design of NPs can influence their inflammatory properties. It has been reported that NP physicochemical properties such as shape (10), hydrodynamic size (11), surface charge (12) (13), (14), surface chemical composition (15) and poly(ethylene glycol) (PEG) chain surface density (16) could influence their cytotoxicity level by modulating the inflammatory and immune-inflammatory responses. PEG is a hydrophilic polymer, widely used as surface coating to improve the NPs stability and reduce their premature clearance from the systemic circulation (17). A few studies have reported the generation of IgM (18) and hypersensitivity reactions to PEG in patients (19). In a previous study, we established a correlation between surface PEG chain length and the extent of PLA-PEG_x NP endocytosis and transcytosis of across an *in vitro* BBB model (20). However, the influence of PEG

chain length on cytotoxicity and induction of inflammatory response by PEGylated NPs in VECs remains to be investigated.

In this article, the impact of PEG chain length at the NPs surface on the cytotoxicity, inflammation response and ROS production on two different VEC models, bEnd.3 cells and HUVEC, was investigated. bEnd.3 is an immortalized mouse brain endothelial cell line used extensively as *in vitro* blood-brain barrier models (21) while HUVEC is a primary human cell used as endothelial human model (22). The expression of genes involved in the inflammation upon exposure to PLA-PEG_x NPs was investigated by qPCR. In addition, ROS production was measured in both VEC models using a DCFH-DA probe.

4.3 Material and Methods

4.3.1 Chemical Materials & Reagents

All chemical and biological reagents are fully described in supplemental material (SM).

4.3.2 Synthesis and characterization of polyethylene glycol-poly (lactic acid)

diblock copolymer

Diblock PLA-PEG_x polymers (X: 1, 2, 5 and 10 kDa) were obtained by ring-opening polymerization (ROP) in the presence of DBU, as previously reported (20). The synthesis is fully detailed in SM.

4.3.3 Nanoparticle preparation and characterization

PLA-PEG_x NPs were prepared by a nanoprecipitation method without any surfactant. PLA-BZ NPs without surfactant (PLA-w/o-F68 NPs) were prepared by injecting PLA-BZ in MilliQ water while PLA-w-F68 NPs were prepared by injecting PLA-BZ in a 1% (w/v) solution of Pluronic[®] F68 in MilliQ water. Nanoparticle preparation and characterization are detailed in SM.

4.3.4 Cell culture

bEnd.3 cells (ATCC CRL-2299) and HUVEC (Lonza, C2519A) were used within 25 and 4 passages for bEnd.3 cells and HUVEC, respectively. bEnd.3 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% (v/v) non-essential amino acid solution and 1% antibiotic solution. Cells were maintained at $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ under a 5% CO_2 atmosphere. HUVEC were grown on regular culture plates in EGMTM medium supplemented with 10% FBS. Cells were maintained at $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ under a 5% CO_2 atmosphere.

4.3.5 Cytotoxicity Assay

The effect of PLA-PEG_x nanoparticle exposure on the mitochondrial activity of endothelial cells was assessed on bEnd.3 and HUVEC cells by using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) test. Cells were seeded at a density of 5×10^3 cells / well in 96-well plates. After 24-h, medium was discarded and replaced by 200 μL /well of PLA or PLA-PEG_x nanoparticles diluted in media at concentrations ranging from 12.5 to 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ($n=4$, *i.e.* four independent assays, each in quadruplicate). Untreated cells were used as negative control, whereas cells exposed to 0.1% Triton-X-100 were used as positive control. Cells were incubated with NPs and positive control. After 24-h, NPs and Triton-X-100 were removed and replaced by fresh media. 50 μL of an MTT solution (5 mg/mL) was added to each well and incubated at 37°C for 3-h. After medium aspiration, 200 μL of DMSO were added to each well to solubilize the MTT formazan crystals. 25 μL of 0.1 M glycine buffer solution at pH 10.5 were then added to each well. Absorbance was measured at 570 nm in a 96-well plate reader (CLARIOstar - BMG Labtech).

4.3.6 Quantitative polymerase chain reaction

The effects of PLA-PEG_x NPs on expression of inflammatory cytokines and chemokines were studied on HUVEC and bend.3 cells. First, cells were seeded in T25 flasks and incubated at 5% CO_2 , 37°C and 95% humidity. After reaching 80% confluence, cells were treated with 1 mg/mL of PLA-PEG_x nanosuspension in culture medium for 6 and 24-h, respectively. 0.2 and 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS solutions were used as positive controls and untreated cells as negative controls. After incubation, the nanosuspensions were removed

and cells were washed twice with PBS. Cells were dissociated by 0.25% trypsin-EDTA phenol red (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France), centrifuged at 1,000 *g* for 5 min and resuspended in PBS. The washing step was repeated twice. Finally, cell pellets were recovered and kept at -80°C until further use.

Total RNA was extracted and purified using RNeasy Microkit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Extracted RNA was treated with DNase (10 U DNase I/ μ g total RNA). RNA concentrations were determined using a ND-2000 NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA). Input RNA concentrations were normalized before the reverse transcription step. First strand cDNA synthesis was performed according to the manufacturer's instructions with a SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France), in combination with random hexamers. Following first-strand cDNA synthesis, cDNAs were purified (Qiaquick PCR purification kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) and eluted in 40 μ L RNase free water (Millipore, Île-de-France, France). cDNA (3 ng) was mixed with Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) and primer mix (0.3 μ M) in a final volume of 10 μ L. Amplification was carried out on a LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) with a first denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 60°C. A melting curve analysis was performed after amplification to determine the primer specificity for the targeted genes. A mean cycle threshold value (Cq) was obtained from 2 measurements for each cDNA. Specific gene expression was calculated by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (23). The gene expression of three housekeeping genes, namely glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), B2M (β 2-Microglobulin) and Beta-actin (ACTB), were applied as reference genes.

4.3.7 Intracellular reactive oxygen species (ROS) measurement

The effects of PLA-PEG_x NP concentrations and exposure time on ROS production were tested on HUVEC and bend.3 cells. Cells were seeded at a density of 1×10^4 cells /well in 96-well microplates and incubated for 24- h at 5% CO₂, 37°C and 95% humidity. Both bEnd.3 and HUVEC cells were grown to approximately 80% confluency and then treated with 200 μ L of PLA-PEG_x NPs at either 50, 250 and 1,000 μ g/mL for 2 and 6-h. LPS at concentrations of 0.2, 0.5 and 1 μ g/mL were used as positive controls (exposure

time: 2 and 6-h). H₂O₂ (0.03 and 0.3% (v/v)) was used as a second positive control to generate a burst of ROS production. The duration of the treatment with H₂O₂ was set at 30 min. After incubation, all media was discarded and cells were washed twice with PBS. They were then incubated with DCFH-DA in media (20 µM) for 30 min and washed 3 times with PBS. Sample fluorescence was assessed at excitation/emission wavelengths of 485/530 nm (CLARIOstar - BMG Labtech).

Sample fluorescence were normalized to cell protein content assessed by Bradford on lysed cells. Briefly, the cells were lysed with 50µL of 0.2 M NaOH and at 37°C for 30 min. 200 µL of Bradford reagent were plated in 96-well plates and then 10 µL of lysed cells were added to each well. A calibration curve was established by using a series of Bovine Serum Albumin (BSA) as protein standards in the 10.9 -700 µg/mL range. The absorbance of 96-well plates was assessed at 595 nm on a plate reader (CLARIOstar - BMG Labtech).

ROS relative level was calculated as follows :

$$\text{ROS relative level} = \frac{\text{Normalized treated cells fluorescence}}{\text{Normalized untreated cells fluorescence}} \quad (1)$$

4.3.8 Statistical analysis

Statistics were performed by using Prism v. 4 software®. Details are provided in the SM section.

4.4 Results

4.4.1 Nanoparticle preparation and characterization

PLA-PEG NPs were formed from PLA-PEG_x copolymers (**Table S1**) displaying a PEG content of less than 15% (w/w). Adjusting the PEG weight content to less than 15% (w/w) yielded solid NPs with similar mechanical properties, as well as comparable colloidal stability in biological environments (24). Indeed, it was previously shown that a PEG content greater than 20% (w/w) led to the formation of polymeric nanoaggregates rather than solid NPs (25),(24).

In this study, in order to assess the influence of PEG chain length on inflammatory processes, NP sizes and PEG chain surface densities were kept constant (Table 4.1). Only

the NP surface charge decreased with increased PEG chain length, which has been previously correlated with enhanced PEG shielding effect (26).

Tableau 4.1 : PLA-PEG NPs characteristics after complete purification (n = 3 (3 independent batches, 3 measurements per batch), mean \pm SD).

NP type	D _H (Z-average) (nm)	PdI	ZP (mV)	PEG surface density ^(a) (chain/nm ²)
PLA (no PEG)	136 \pm 2	0.25 \pm 0.10	-30 \pm 1	NA
PLA-W-F68	120 \pm 2	0.19 \pm 0.07	-24 \pm 1	0.10 \pm 0.01
PLA-PEG _{1kDa}	104 \pm 2	0.13 \pm 0.02	-22 \pm 2	0.18 \pm 0.02
PLA-PEG _{2kDa}	106 \pm 1	0.17 \pm 0.01	-15 \pm 2	0.20 \pm 0.03
PLA-PEG _{5kDa}	109 \pm 1	0.14 \pm 0.01	-12 \pm <1	0.18 \pm 0.02
PLA-PEG _{10kDa}	108 \pm 2	0.11 \pm 0.02	-10 \pm 1	0.19 \pm 0.01

D_H: Hydrodynamic diameter; PdI: Polydispersity index; ZP: Zeta potential

NA: Not Applicable

(a) For PEG density calculations, please refer to supplemental material

4.4.2 Cytotoxicity Assay

The cell viability of bEnd.3 cells and HUVEC upon exposure to PLA, PLA-w-F68 and PLA-PEG_x NPs ranging from 12.5 to 1000 μ g/mL was determined after a 24-h incubation time. Cell viability of bEnd.3 cells measured after 24-h exposure to PLA and PLA-PEG_{1kDa} NPs decreased significantly (around 80%) compared to untreated cells over the entire studied concentration range (Figure 4.1 a and S1). However, no significant effects on the viability were observed after exposing bEnd.3 cells to PLA-W-F68 and PLA-PEG_{2kDa}, PLA-PEG_{5kDa} and PLA-PEG_{10kDa} (Figure 4.1 a).

In a similar manner, incubation of HUVEC cells with PLA-PEG_x NPs with X > 1kDa did not elicit any mitochondrial injuries as assessed by the MTT assay, even at the highest NP concentration (1,000 μ g/mL) tested. However, mitochondrial injuries of HUVEC cells increased significantly for cells treated with PLA, PLA-W-F68 and PLA-PEG_{1kDa} NPs at concentrations higher than 500 μ g/mL, yet viability remained above 80%. (Figure 4.1 b and S1). According to the International Organization for Standardization (ISO), if the cell viability remains above 70%, the material is considered non-toxic (27).

As cell viabilities did not decrease below 80%, even for the highest NPs concentrations for the two cell lines, NPs concentrations were set at 1,000 $\mu\text{g/mL}$, *i.e.* at a subtoxic concentration for the subsequent experiments.

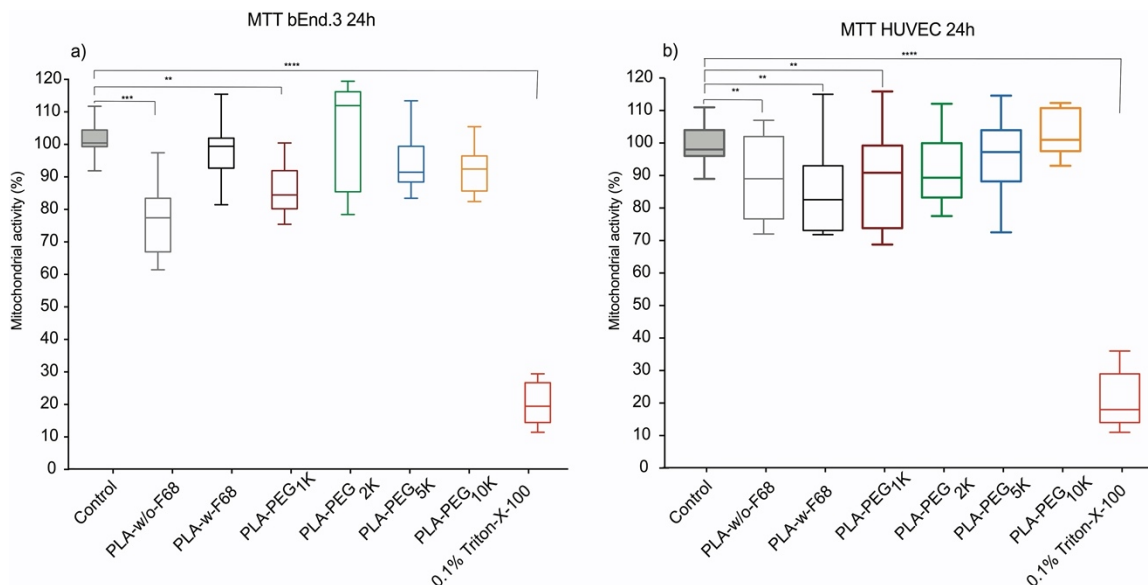


Figure 4.1 : Cell viability of a) bEnd.3 cells and b) HUVEC after a 24-h exposure to PLA-w/o-F68, PLA-w-F68 and PLA-PEG_x at 1,000 $\mu\text{g/mL}$. The box and whiskers display the median, lower and upper quartiles and 95% confidence interval around the median; n= 4, 4 independent assays and quadruplicate wells per sample per assay). *: p < 0.05, **: p < 0.01, *** : p < 0.001.

4.4.3 Quantitative polymerase chain reaction

To delineate the effect of PEG chain length of PLA-PEG_x NPs on the inflammatory response in bEnd.3 cells and HUVEC, we assessed the relative gene expression of 24 inflammatory cytokines and chemokines by qPCR after 6 or 24-h incubation. Responses to PLA-w-F68 NPs, wherein Pluronic® F68 is a surfactant widely used in nanoformulations, were evaluated in a similar manner.

Among the 24 cytokines and chemokines tested, mRNA for 10 and 14 pro-inflammatory cytokines and chemokines were detected in bEnd.3 cells (**Table S2**) and HUVEC (**Table S3**), respectively.

The comparison between the relative expression of inflammatory cytokines and chemokines in bEnd.3 cells and HUVEC showed a general overlap in terms of pattern and timing of gene expression (Figure S4 a-j).

Gene expression in bEnd.3 cells

The Relative Quantification (RQ) of mRNA expression levels of IL-6, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CCL2, ICAM1 and M-CSF in PLA-W-F68 NPs-treated bEnd.3 cells for 6 and 24-h, were lower than 2. These relative gene expression values were below the detection threshold and therefore could not be considered as biologically significant. A 2-fold change is considered to be the minimum for biological significant response to treatment in q-PCR analysis (28).

A similar pattern was observed for the expression of IL-6 and CXCL1 relative levels in bEnd.3 cells (Figure 4.2 a & 4.2 b). bEnd.3 cells, incubated for 6 and 24-h with PLA-PEG_{1kDa}, displayed a non-significant level of IL-6 and CXCL1 gene expression. On the other hand, the relative mRNA expression of IL-6 and CXCL1 transiently increased following treatment with PLA-PEG_x NPs for 6-h for PEG chain lengths greater than 2kDa, but they returned to non-significant levels after 24-h. Moreover, no statistically significant difference of mRNA expression level of IL-6 and CXCL1 was observed between PLA-PEG_x NPs with different PEG chain lengths. In contrast, IL-6 and CXCL1 mRNA levels were significantly elevated in LPS-induced bEnd.3 cells after 6-h and still remained elevated after 24-h, however at a lower level (Figure 4.2 a & 2 b).

After a 6-h incubation, CXCL10, CCL2 and ICAM-1 (Figure 4.2 c, e & f) gene expressions in bEnd.3 cells treated with PEGylated NPs revealed a significant level of these genes compared to untreated cells. Additionally, in LPS-treated bEnd.3 cells, relative levels of mRNA for CXCL10, CCL2 and ICAM-1 were transiently elevated. At 24-h, levels of CXCL10 mRNA remained elevated in bEnd.3 cells treated with PEGylated NPs, with the exception of PLA-PEG_{10kDa}. However, CCL2 and ICAM-1 gene expressions were observed at a non-significant level at 24-h.

Relative levels of CXCL11 (Figure 4.2 d) expression for cells treated with PEGylated NPs for 6-h remained unaltered for PEG chain lengths shorter than 10 kDa. Additionally, while CXCL11 expression levels detected in bEnd.3 cells treated with LPS were 200- to 400-fold that of untreated cells at 6-h, this increase was short-lived and was found to be undetectable at 24-h.

M-CSF mRNA relative levels after 6-h exposure to PEGylated NPs were 8- to 14-fold higher than untreated cells and remained elevated by 2- to 6- fold at 24-h. Similarly, levels of M-CSF gene expression for the cells treated with LPS for 6 or 24-h remained at a significantly high level (Figure 4.2 g).

TIMP-1, NFkB1 and NFkB3 gene expression did not change significantly at either 6 or 24-h for NP- or LPS-treated bEnd.3 cells (Figure S2).

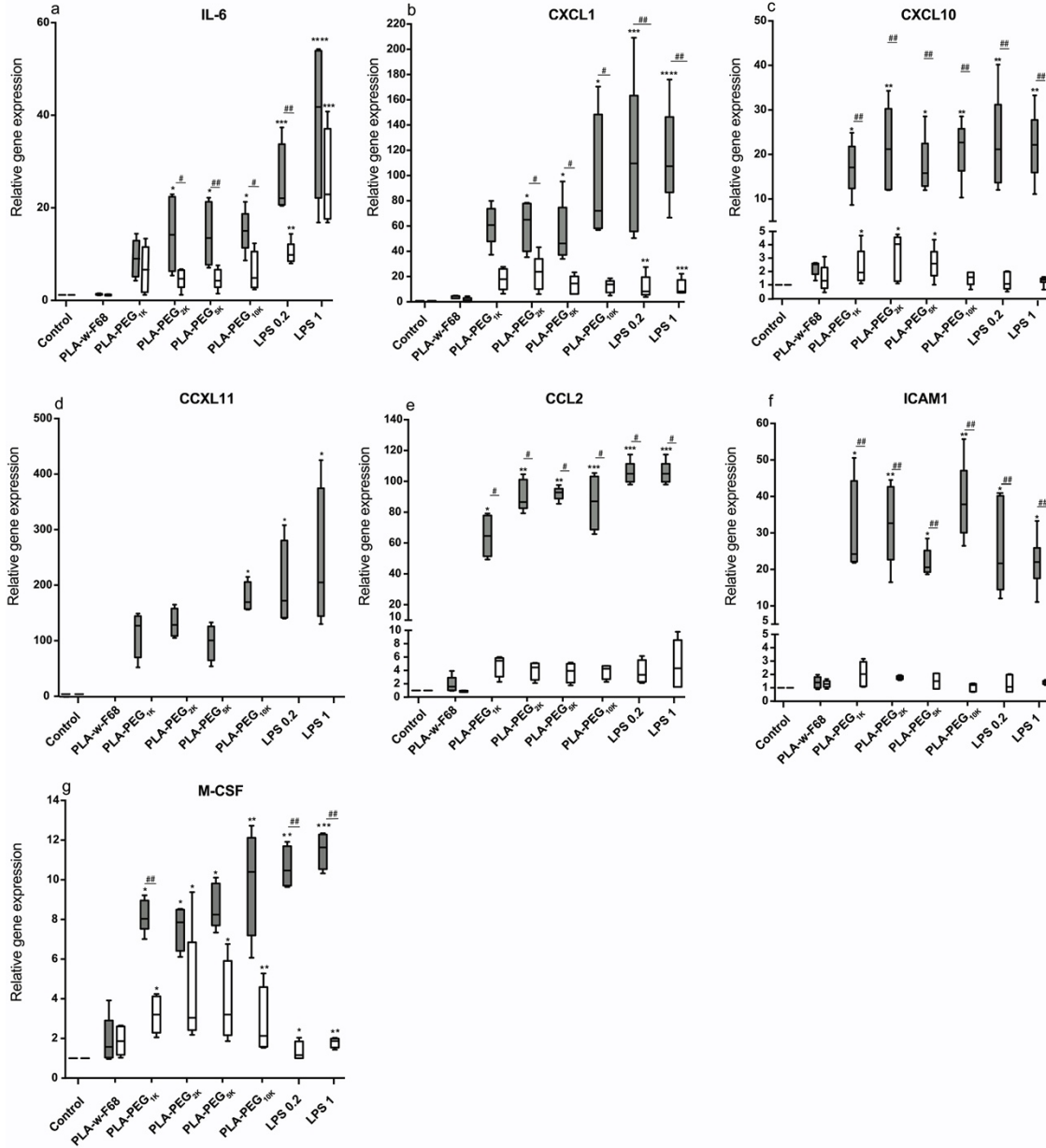


Figure 4.2: Relative mRNA expression inflammatory cytokines and chemokines in treated bEnd.3 cells versus untreated cells. Cells treated with PLA-w-F68, PLA-PEG_x NPs for 6-h (grey bars) and 24-h (white bars). a: IL-6, b: CXCL1, c: CXCL10 d: CXCL11 e: CCL2 f: ICAM1 g: M-CSF n= 4 independent samples: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ represent the difference significance compared to untreated cells. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ represent the difference significance between samples treated for 6-h versus those treated for 24-h.

Gene expression in HUVEC

The relative expression of IL-6, IL-1 α , IL- β , CXCL1, CXCL10, CXCL11, CCL2, NFKB1 genes in HUVEC treated with PLA-W-F68 NPs at 6 and 24-h did not increase significantly compared to untreated cells (Figure 4.3 a-h).

The relative mRNA expression levels of three interleukins (IL-6, IL-1 α , IL- β) and of CXCL1 chemokine significantly increased for cells treated with PEGylated NPs at 6-h, for PEG lengths higher than or equal to 5 kDa, but decreased to non-significant levels at 24-h. In contrast, the relative mRNA levels of three interleukins and CXCL1 were significantly enhanced at 6 and 24-h in LPS-induced HUVEC (Figure 4.3 a-d).

CXCL10 and CCL2 mRNA expression levels (Figure 4.3 e, 3g) were significantly increased after 6-h exposure to LPS and PEGylated NPs with PEG lengths higher than 1kDa. After 24-h, the level of CXCL10 expression dropped significantly after 24-h but still remained significantly elevated for NPs with PEG lengths greater than 2kDa and for LPS-treated cells, while significantly high levels of CCL2 mRNA expression endured for LPS-treated cells only.

HUVEC cells, after 6-h incubation with PEGylated NPs, expressed significant levels of CXCL11, particularly for PEG chain lengths higher than 5kDa (Figure 4.3 f). Unexpectedly, this level significantly increased after 24-h. Interestingly, a similar CXCL11 expression pattern was observed for HUVEC cells treated with LPS 0.2 μ g/mL. On the other hand, cells treated with 1 μ g/mL LPS did not show a significant difference in CXCL11 expression levels between 6-h and 24-h exposure (Figure 4.3 f).

NFKB1 mRNA expression (Figure 4.3 h) after 6-h incubation with PEGylated NPs or LPS significantly increased, but decreased after 24-h to a non-significant level.

The mRNA expressions of IL-12, M-CSF, ICAM, TMP1, and NFKB1 in HUVEC, incubated with either NPs or LPS, were found below the detection threshold of q-PCR (Figure S3).

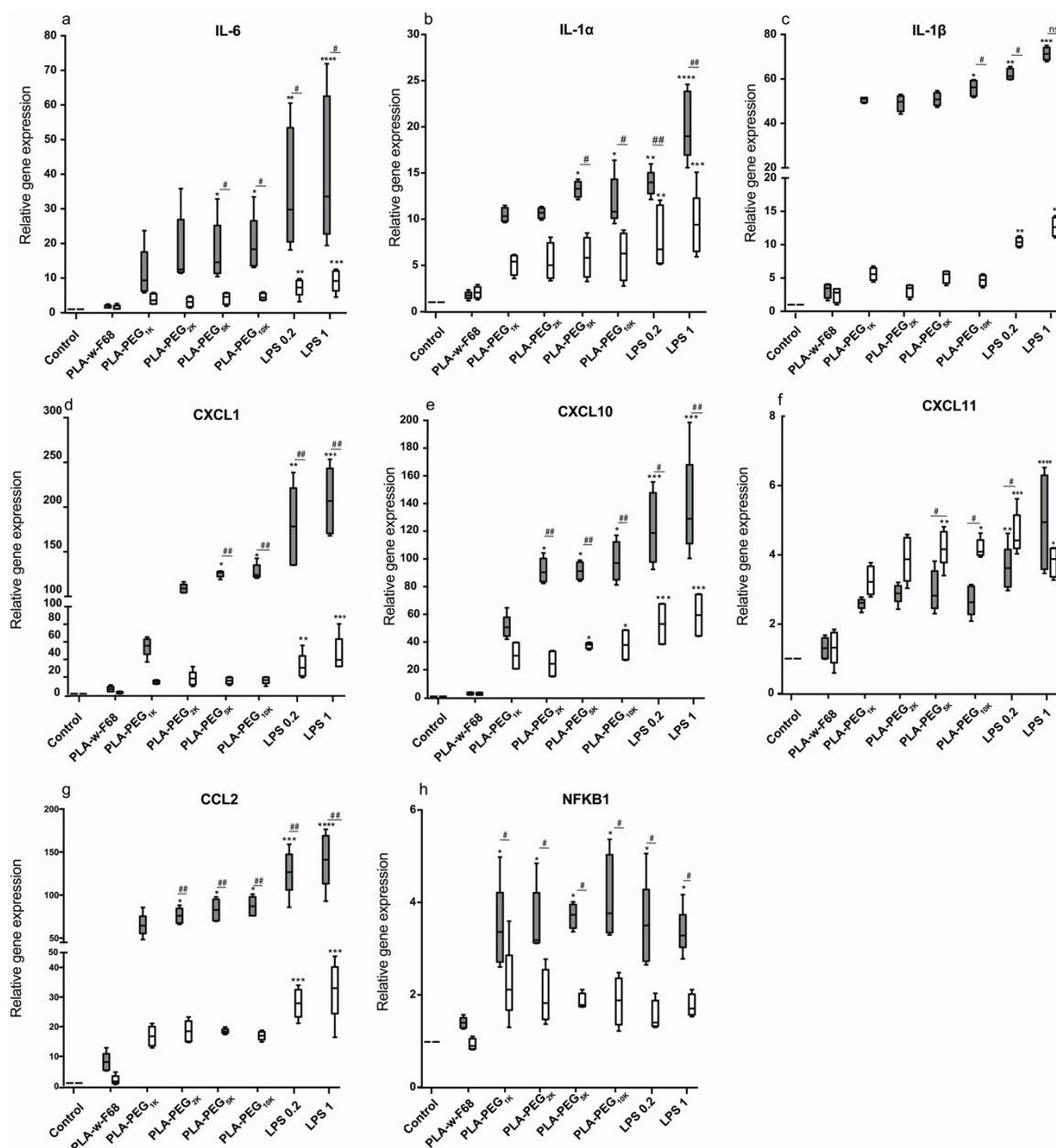


Figure 4.3: Relative mRNA expression of inflammatory cytokines and chemokines in treated HUVEC versus untreated cells. Cells treated with PLA-w-F68, PLA-PEG_x NPs for 6-h (grey bars) and 24-h (white bars). a: IL-6, b: IL-1 α , c: IL-1 β , d: CXCL1, e: CXCL10, f: CXCL11, g: CCL2, h: NFKB1 n= 4 independent samples: * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001 represent the difference significance compared to untreated cells. # p < 0.05, ## p < 0.01, and ### p < 0.001 represent the difference significance between samples treated for 6-h versus those treated for 24-h.

4.4.4 Intracellular reactive oxygen species measurement

The evolution of ROS levels over time was estimated by quantifying ROS production at 2-h and 6-h following cell exposure to the NPs. Since ROS are short-lived chemical species, a short incubation time was chosen (2-h). A second time point at 6-h was selected, as relatively high levels of gene expression for inflammatory cytokines and chemokines were detected upon NP and LPS exposure at this time point (Figure 4.2 & 4.3).

The relative ROS levels in bEnd.3 cells and HUVEC treated with the highest concentration of NPs (1,000 $\mu\text{g/mL}$) are shown in Figure 4.4. The relative ROS level in cells treated with low (250 $\mu\text{g/mL}$) and medium (500 $\mu\text{g/mL}$) concentrations of NPs are shown in Figure S5.

The ROS relative levels in bEnd.3 cells treated for 2 and 6-h did not significantly increase with any of the tested PEGylated NPs. The same result was found for PLA-w/o-F68 and PLA-w-F68 NPs (Figure 4.4). Moreover, no significant difference was found between ROS production levels in bEnd.3 cells treated with either low, medium or high concentrations of NP suspension.

The ROS relative levels in bEnd.3 cells treated for 2-h and 6-h with LPS, used as a positive control, increased significantly (Figure 4.4). Neither a dose-response relationship nor an effect of exposure time was observed in ROS production. However, the ROS generation in LPS-treated bEnd.3 cells significantly increased only for LPS concentrations higher than 0.2 $\mu\text{g/mL}$ at 2-h and 6-h (Figure 4.4).

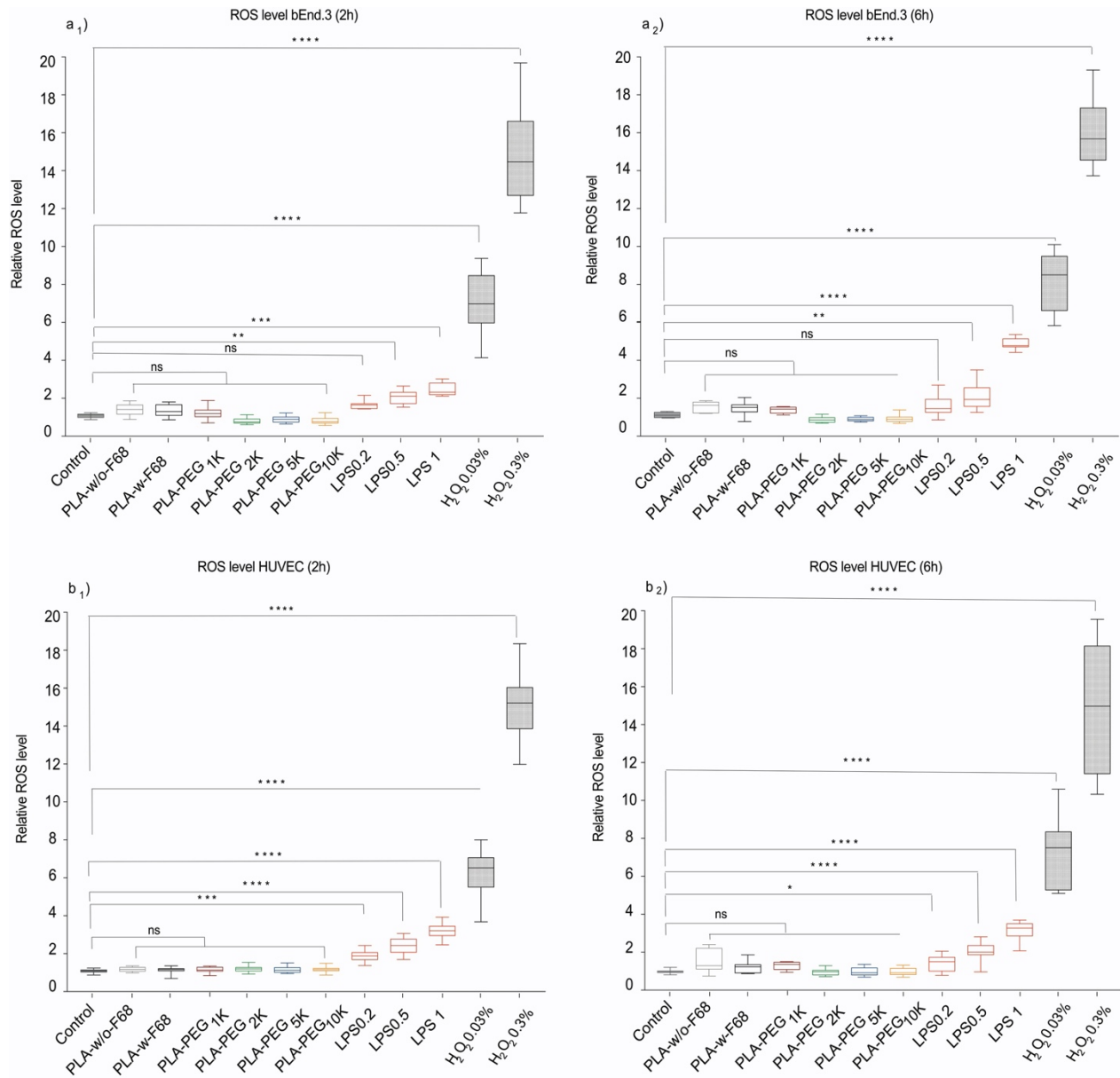


Figure 4.4: Oxidative stress response after treating bEnd.3 cells and HUVEC with PLA-w/o-F68, PLA-w-F68 and PLA-PEGx NPs for either 2-h (a₁, b₁) or 6-h (a₂, b₂). Untreated cells were used as negative controls and LPS and H₂O₂ were used as positive controls. The box and whiskers display the median, lower and upper quartiles and 95% confidence interval around the median; n= 4: 4 independent assays and quadruplicate wells per sample per assay. * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001 represent the difference compared to the untreated cell groups.

A similar pattern in the generation of ROS was observed with HUVEC. While the relative ROS production in cells treated with PLA-w/o-F68, PLA-w-F68 and PLA-PEG_x NPs did not increase at either 2 or 6-h, cells treated with LPS for 2 and 6-h exhibited significantly increased ROS levels (Figure 4b1 and b2). H₂O₂, as a positive control, generated high levels of ROS in both bEnd.3 cells and HUVEC in a concentration-dependent manner (Figure 4.4).

4.5 Discussion

In this study, exposure to PLA-PEG_x NPs induced a short-lived mild acute inflammatory response in VEC cell lines. However, these observations were independent of PEG chain length, as assessed by the relative mRNA expression levels of various inflammatory cytokines and chemokines. Non-significant differences in expression of inflammatory genes were observed between cells treated with PEGylated NPs or LPS. In addition, PLA-PEG_x NPs did not induce ROS generation despite triggering a certain level of inflammatory cytokine and chemokine gene expression.

A selected set of inflammatory cytokines and chemokines, as well as adhesion molecules and transcription factor (Table S2 and S3) were thoroughly investigated in response to exposure to polymeric NPs. Three groups of NPs were tested: PLA-PEG_x NPs with PEG chain coating covalently attached to NP surface (x between 1 and 10 kDa); pure PLA (PLA-w/o-F68) NPs and PLA-w-F68 NPs with PPO-PEG chains adsorbed onto the NP surface. PLA NPs were used as control to clarify the influence of the PEG coating on the induction of inflammation. Expression levels of inflammatory cytokine and chemokine mRNA in bEnd.3 cells and HUVEC in contact with PLA NPs were evaluated. However, PLA NPs demonstrated low colloidal stability, rapidly precipitating in culture medium (20). The separation of PLA NP aggregates from cells was not technically feasible. Thus, the PLA NPs were excluded from qPCR analyses. To further investigate the influence of PEG coating, pure PLA NPs were thus prepared with F68, a non-ionic surfactant stabilizing particles by adsorption at their surface. F68 is a triblock copolymer which contains two chains of 3kDa-PEG attached to a central block of poly (propylene glycol), widely used in nanoformulation. In contrast to PEGylated NPs in which the PEG chains are covalently attached to the NPs, in PLA-w-F68 NPs, F68 is strongly physisorbed onto the PLA core

and forms a dynamic corona on the surface of the NPs. Therefore, there is an equilibrium between F68 adsorbed on the surface of the NPs and F68 remaining in the bulk solution (29). PLA-w-F68 PEG density at equilibrium state is lower than PEG chain densities found for PEGylated NPs (Table 4.1).

4.5.1 Interleukin expression

The same pattern of interleukin gene expression in response to either LPS or NPs was observed in HUVEC and bEnd.3 cells, except that HUVEC expressed IL-6, IL-1 α and IL- β while bEnd.3 cells expressed only IL-6. This difference was not surprising as mRNA expression levels of cytokines in response to the same inflammatory agent can vary among different cell types (30).

Secretion of IL-6 and IL-1 plays a key role in acute inflammatory responses (31). Transient IL-1 and IL-6 mRNA expression enhancement in both cell lines implies that an acute inflammation response was induced by PLA-PEG_x NPs. One of the rare studies evaluating the inflammatory properties of polymeric NPs showed that secretion of IL-6 by HUVEC was not enhanced upon contact with poly[acrylonitrile-co-(N-vinylpyrrolidone)] NPs for a 72-h exposure (32). However, this longer exposure time may not be optimal to detect cytokine expression, which is usually associated with acute phase events. In contrast to PEGylated NPs, inorganic NPs induced IL-6 and IL-1 β gene expression in HUVEC, still significantly elevated even after 24-h (33) (34). With regards to the current study, the pattern of IL-1 and IL-6 gene expression following contact with inorganic NPs is closer to the expression pattern generated in LPS-treated cells than those in PLA-PEG_x NP treated cells (Figure 4.2 & Figure 4.3). As for IL-1 and IL-6, mRNA expression levels suggest that LPS induced an acute inflammatory response associated with elevated expression of cytokines even after 24-h (Figure 4.2 & Figure 4.3). The inflammatory response triggered by LPS *via* the Toll-like receptor 4 (35) is long-lasting compared to that of PLA-PEG_x NPs.

4.5.2 Tumor necrosis factor and colony stimulating factor expression

Tumor Necrosis Factor (TNF α) is one of the most important cytokines, promoting the expression of many other cytokines and chemokines (36) (37, 38). The expression of TNF α mRNA in LPS-induced HUVEC was found to be maximal after 1-h stimulation and decreased sharply after 2-h, to reach undetectable levels at 6-h (39). Due to this early gene

expression response, as expected, the mRNA levels of TNF α were not observed either at 6-h or at 24-h in our studies. No conclusion could therefore be drawn regarding the possible induction of TNF α by PEGylated polymeric NPs.

Macrophage–Colony Stimulating Factor (M-CSF) is a cytokine which regulates monocyte survival and maturation and mediates the differentiation of monocytes into macrophages (40). PLA-PEG_x NPs increased significantly the expression of M-CSF in bEnd.3 cells at 6-h and 24-h. Interestingly PLA-PEG_x NPs induced the same gene expression pattern as LPS (Figure 4.2 g).

4.5.3 Inflammatory chemokines

Non-activated endothelial cells do not secrete pro-inflammatory chemokines. Therefore, the increase in the mRNA level of chemokines is an indicator of the triggered inflammatory response (41). Moreover, cytokines and chemokines are often generated in a cascade. In other words, the expression of two or more cytokines or chemokines can synergistically stimulate the expression of other cytokines and chemokines (38). For instance, IL-6 secretion was observed to upregulate CXCL1 expression in brain endothelial cells (42). Consistent with an acute inflammatory response, the expression of CXCL1 in HUVEC and bEnd.3 cells transiently increased after 6-h exposure to PLA-PEG_x NPs. Unlike TiO₂ NPs, PLA-PEG_x NPs produced a shorter-term expression of CXCL1. Indeed, the expression of CXCL1 in brain endothelial cells in contact with TiO₂ NPs is much more pronounced (300 fold vs. untreated cells) after 24-h and it remained high even after five days (43).

CXCL10 (44) and CXCL11 (45) mRNA expression levels increased, thus constituting an indicator of the inflammatory response. Actually, CXCL10 and CXCL11 induce recruitment and activation of neutrophils and adhesion of T-cells to endothelial cells, respectively (46). However, CXCL10 and CXCL11 gene expressions in VECs, in response to an exposure to polymeric NPs, have not yet been explored. CXCL10 and CXCL11 mRNA levels remained high upon cell exposure to PLA-PEG_x NPs after 24-h. This finding suggests that PLA-PEG_x NPs could potentially induce a longer-lasting inflammatory response, involving immune cell recruitment.

PEGylated PLA NPs induced the gene expression of monocyte chemoattractant chemokine CCL2 in bEnd.3 cells and HUVEC at 6-h (Figure 4.2 e & 4.3 g). Our results suggested that PLA-PEG_x NPs may initiate monocyte recruitment and adhesion to activated endothelial cells (34). PEGylated Au NPs, with sizes similar to our NPs, did not significantly increase CCL2 secretion in HUVEC at short (4-h) or medium-term incubation times (24-h or 72-h) (47). This difference could be explained by different NP doses (150 µg/mL vs. 1,000 µg/mL), or by the mechanical properties of NP core due to core deformability, affecting PEGylated NP uptake rate in VECs (48). The duration of CCL2 gene expression induction by PLA-PEG_x NPs was shorter than its induction with highly inflammatory NPs, such as silica or TiO₂ NPs. The latter showed significantly higher CCL2 expression levels, even after 24-h, compared to controls (34) (43).

4.5.4 Adhesion molecule

Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is an adhesion molecule whose main role is to mediate the adhesion of leukocytes to endothelial cells in an acute or chronic inflammatory situation (49). ICAM-1 gene expression in bEnd.3 cells increased significantly in the presence of PLA-PEG_x NPs (Figure 4.2 f). However, its gene expression levels in HUVEC were not significantly modified upon NP exposure (Figure S3c). This was not surprising as even highly inflammatory NPs such as Co₃O₄ and TiO₂ NPs only induced a modest increase (2-fold) of gene expression levels in treated HUVEC (50). On the other hand, PEGylated Au NPs did not increase significantly the secretion of ICAM-1 from HUVEC following short (4-h) or medium incubation periods (24-h or 72-h) (47).

4.5.5 Transcription factor: NF-κB

NF-κB is a pleiotropic transcription factor playing a pivotal role in controlling gene expression of cytokines such as TNF-α, IL-1, IL-6, chemokines such as CCL2, CXCL1, CXCL10 and adhesion molecules including ICAM-1. Its action is triggered by different cues, including LPS through Toll-like receptors (51). PLA-PEG_x NPs upregulated significantly NF-κB1 gene expression in HUVEC Figure 4.3 h, but not in bEnd.3 cells (Figure S2). This difference could be related to the cell origin (human umbilical vs. mouse brain) and cell type (immortalized vs. primary cells). Interestingly, the expression of IL-1

and NF- κ B1 increased simultaneously only in HUVEC. Thus, it is hypothesized that NF- κ B1 could participate in upregulating the gene encoding IL-1.

4.5.6 Covalent vs physisorbed PEG-coated NPs

Cytokine and chemokine gene expressions did not significantly increase upon exposure to PLA-w-F68 NPs, contrary to exposure to PEGylated NPs (Figure 4.2 & 4.3). This behavioral difference could be related to differences in PEG chain surface density (Table 4.1) and in the nature of chemical interactions between PEG chains and NP cores. Our results contrasted with a previous study reporting an increased secretion of CCL2 and IL-6 after a 24-h exposure of epithelial cells to PLGA-w-F68 NPs (52). This disparity could stem from differences in cell type used in the assays and the fact that supplementary regulations could take place at the protein translation step. Interestingly, this study also showed that free F68 did not increase CCL2 and IL-6 secretions (52). This last result emphasizes the significant role the nature of the PEG chain chemical bonding (free molecules, physisorbed or covalently tethered to a NP core) can play in inducing inflammatory responses.

4.5.7 ROS generation by NP exposure

ROS generation and inflammation processes are tightly linked and there is a mutual relation between their induction, wherein ROS can induce cytokine production and pro-inflammatory cytokines tend to increase ROS levels (53). Inflammation induced by metal NPs has been linked to ROS generation at the NP surface or through metal ion release (54), (55). However, the information regarding relation between inflammation and ROS generation by polymer NPs is scarce. Recently, positively-coated, PLGA-based NPs were found to increase ROS generation (56). In our case, all tested NPs failed to significantly increase ROS generation (Figure 4.4). These results are in line with those obtained by Yu *et al.* showing that a PEG coating added on the surface of iron oxide NPs decreased ROS generation compared to bare iron oxide NPs (57). Contrary to PEGylated NPs, LPS exposure generated a significant level of ROS in both bEnd.3 and HUVEC, as previously reported (58, 59). LPS can generate ROS by cytokine-dependent and cytokine-independent mechanisms. In cytokine-dependent mechanisms, LPS triggers the NF- κ B signaling pathway which induces the expression of pro-inflammatory cytokines (59), stimulating

ROS production via the NADH oxidase (60). Cytokine expressions upon PLA-PEG_x NPs or LPS exposures were not significantly different in bEnd.3 cells and HUVECs. It can therefore be hypothesized that, during LPS exposure, ROS were mainly generated via a cytokine-independent pathway whereas PEGylated NPs are not able to induce ROS production through this pathway.

4.5.8 Inflammation induction mechanism by polymeric NPs

The mechanisms by which polymeric NPs might induce these responses are currently unexplored. Carbon NPs were shown to act through the direct interactions of NPs with Toll-like receptors to induce inflammatory responses (61). The roles of carbon NP surface and size on inflammation promotion have been highlighted in epithelial pulmonary cells (62). Krüger *et al.* showed that inhibiting endocytic pathways decreased the inflammatory response induced by TiO₂ NPs in Caco-2 cells (63). These results demonstrated that the NPs endocytosis rate could play an important role in the induction of an inflammatory response. The inflammatory response upon contact with PLA-PEG_x NPs became significant for longer PEG chains (Figure 4.2 & 4.3). This result is in agreement with our previous study showing an increased NP endocytosis rate with increasing PEG chain length(20). Overall, these results suggest that the inflammation response triggered by PEGylated NPs occurs intracellularly.

In vivo, inflammation events in response to NPs are the result of a complex interplay of different cell lineages. VECs are only one element of the puzzle. Interestingly, Liu *et al.* demonstrated that the production of inflammatory cytokines and chemokines induced by silica NPs was significantly higher in a co-culture model of monocyte and endothelial cells than in a HUVEC monoculture model (64). Notwithstanding what is currently known of the central role played by endothelial cells in the inflammatory response to NPs, exploring the interactions between endothelial and immune cells is key to achieving a deeper understanding of the inflammatory and immune responses to Pegylated NPs *in vivo*.

4.6 Conclusion

The inflammatory response to polymeric NPs is an underexplored topic. This study intended to fill the knowledge gap relative to PEGylated polymer NPs inflammation-mediated nanotoxicity.

Overall, the lesson learnt from this systematic exploration of the inflammatory response of VECs upon exposure to PEGylated NPs was that NPs trigger a transient increase in gene expression of some important inflammatory cytokines and chemokines. While PEG chain length could not be correlated to the inflammatory response observed, PEG chain attachment (tethered or physisorbed) was shown to modulate significantly cytokines and chemokine production.

The effects of longer exposures as well as accumulation of polymeric NPs in VECs still remain to be explored to obtain a more complete representation of the inflammatory response to polymeric NPs. Likewise, the interactions of VECs with immune cells upon PEGylated NP exposure *in vivo* warrant further investigation.

Supplemental material

Chemical Materials & Reagents, Synthesis and characterization of polyethylene glycol-poly (lactic acid) diblock copolymer, Nanoparticle preparation and characterization, Statistical analysis, Cytotoxicity Assay, Quantitative polymerase chain reaction of inflammatory cytokine and chemokine, Comparison of gene expression pattern between bEnd.3 and HUVEC Intracellular reactive oxygen species measurement can be found in Annexe 2.

Acknowledgments

S.F.T thanks « Mitacs-Globalink Research Award » and « Programme de bourses pour de courts séjours d'études universitaires à l'extérieur du Québec » from the Ministry of Education and Higher Education of Québec (MEES) and the Faculty of pharmacy of the Université de Montréal for travel award. P.H. acknowledges support by NSERC. JMR thanks the NSERC/CRSNG postdoctoral grant program for financial support. This study was partially supported by a “Fonds de Recherche du Québec, Nature et Technologies” grant (FRQ-NT, Government of Québec, Canada; grant # 191486) and by the “Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer” (France).

Declaration of interest

The authors declared no conflict of interest.

4.7 References

1. Nie S. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine*. 2010;5(4):523-8.
2. Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J. Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(2):264-73.
3. Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *International journal of nanomedicine*. 2007;2(2):129-41.
4. Ling D, Hyeon T. Chemical Design of Biocompatible Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. 2013;9(9-10):1450-66.
5. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano today*. 2015;10(4):487-510.
6. Trickler WJ, Lantz SM, Murdock RC, Schrand AM, Robinson BL, Newport GD, et al. Silver Nanoparticle Induced Blood-Brain Barrier Inflammation and Increased Permeability in Primary Rat Brain Microvessel Endothelial Cells. *Toxicological Sciences*. 2010;118(1):160-70.
7. Dietrich J-B. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood–brain barrier. *Journal of Neuroimmunology*. 2002;128(1):58-68.
8. Abbott NJ. Inflammatory Mediators and Modulation of Blood–Brain Barrier Permeability. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2000;20(2):131-47.
9. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*. 2018;14:133.
10. Zhang B, Sai Lung P, Zhao S, Chu Z, Chrzanowski W, Li Q. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Scientific Reports*. 2017;7(1):7315.
11. Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. 2009;5(13):1553-61.
12. Tan Y, Li S, Pitt BR, Huang L. The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo. *Human gene therapy*. 1999;10(13):2153-61.
13. Kedmi R, Ben-Arie N, Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials*. 2010;31(26):6867-75.
14. Rabanel J-M, Adibnia V, Tehrani SF, Sanche S, Hildgen P, Banquy X, et al. Nanoparticle heterogeneity: an emerging structural parameter influencing particle fate in biological media? *Nanoscale*. 2019;11(2):383-406.
15. Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*. 2007;127(1):143-53.
16. Bertrand N, Grenier P, Mahmoudi M, Lima EM, Appel EA, Dormont F, et al. Mechanistic understanding of in vivo protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics. *Nature communications*. 2017;8(1):777.

17. Amoozgar Z, Yeo Y. Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2012;4(2):219-33.
18. Grenier P, de Oliveira Viana IM, Lima EM, Bertrand N. Anti-polyethylene glycol antibodies alter the protein corona deposited on nanoparticles and the physiological pathways regulating their fate in vivo. *Journal of controlled release*. 2018;287:121-31.
19. Wenande E, Garvey LH. Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2016;46(7):907-22.
20. F.Tehrani S, Bernard-Patrzynski F, Puscas I, Leclair G, Hildgen P, Roullin VG. Length of surface PEG modulates nanocarrier transcytosis across brain vascular endothelial cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2019;16:185-94.
21. Brown RC, Morris AP, O'Neil RG. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain research*. 2007;1130:17-30.
22. Onat D, Brillon D, Colombo PC, Schmidt AM. Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis. *Current diabetes reports*. 2011;11(3):193-202.
23. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002;3(7):research0034.1.
24. Rabanel J-M, Faivre J, Tehrani SF, Lalloz A, Hildgen P, Banquy X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7(19):10374-85.
25. Riley T, Stolnik S, Heald CR, Xiong CD, Garnett MC, Illum L, et al. Physicochemical Evaluation of Nanoparticles Assembled from Poly(lactic acid)-Poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) Block Copolymers as Drug Delivery Vehicles. *Langmuir*. 2001;17(11):3168-74.
26. Gref R, Lück M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2000;18(3-4):301-13.
27. International Organization for Standardization I-B. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization Geneva, Switzerland; 2009.
28. Edmunds RC, McIntyre JK, Luckenbach JA, Baldwin DH, Incardona JP. Toward enhanced MIQE compliance: reference residual normalization of qPCR gene expression data. *Journal of biomolecular techniques : JBT*. 2014;25(2):54-60.
29. Al-Hanbali O, Rutt KJ, Sarker DK, Hunter AC, Moghimi SM. Concentration dependent structural ordering of poloxamine 908 on polystyrene nanoparticles and their modulatory role on complement consumption. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2006;6(9-10):3126-33.

30. Mano SS, Kanehira K, Sonezaki S, Taniguchi A. Effect of polyethylene glycol modification of TiO₂ nanoparticles on cytotoxicity and gene expressions in human cell lines. *Int J Mol Sci.* 2012;13(3):3703-17.
31. Zhang J-M, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics.* 2007;45(2):27-37.
32. Wischke C, Krüger A, Roch T, Pierce BF, Li W, Jung F, et al. Endothelial cell response to (co)polymer nanoparticles depending on the inflammatory environment and comonomer ratio. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2013;84(2):288-96.
33. Corbalan JJ, Medina C, Jacoby A, Malinski T, Radomski M. Amorphous silica nanoparticles trigger nitric oxide/peroxynitrite imbalance in human endothelial cells: Inflammatory and cytotoxic effects 2011. 2821-35 p.
34. Guo C, Xia Y, Niu P, Jiang L, Duan J, Yu Y, et al. Silica nanoparticles induce oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction in vitro via activation of the MAPK/Nrf2 pathway and nuclear factor-kappaB signaling. *International journal of nanomedicine.* 2015;10:1463-77.
35. Wang W, Deng M, Liu X, Ai W, Tang Q, Hu J. TLR4 activation induces nontolerant inflammatory response in endothelial cells. *Inflammation.* 2011;34(6):509-18.
36. Turner NA, Mughal RS, Warburton P, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Mechanism of TNF α -induced IL-1 α , IL-1 β and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: Effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovascular Research.* 2007;76(1):81-90.
37. Lo H-m, Lai T-h, Li C-h, Wu W-b. TNF- α induces CXCL1 chemokine expression and release in human vascular endothelial cells in vitro via two distinct signaling pathways. *Acta pharmacologica Sinica.* 2014;35(3):339-50.
38. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical pharmacology.* 2009;78(6):539-52.
39. Imaizumi T, Itaya H, Fujita K, Kudoh D, Kudoh S, Mori K, et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or interleukin-1alpha. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2000;20(2):410-5.
40. Green M, Harrington MA. A comparison of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) gene expression in primary and immortalized endothelial cells. *Journal of hematotherapy & stem cell research.* 2000;9(2):237-46.
41. Speyer CL, Ward PA. Role of endothelial chemokines and their receptors during inflammation. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research.* 2011;24(1):18-27.
42. Roy M, Richard J-F, Dumas A, Vallières L. CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis. *Journal of neuroinflammation.* 2012;9(1):18.
43. Brun E, Carrière M, Mabondzo A. In vitro evidence of dysregulation of blood-brain barrier function after acute and repeated/long-term exposure to TiO₂ nanoparticles. *Biomaterials.* 2012;33(3):886-96.
44. Sorensen EW, Lian J, Ozga AJ, Miyabe Y, Ji SW, Bromley SK, et al. CXCL10 stabilizes T cell-brain endothelial cell adhesion leading to the induction of cerebral malaria. *JCI insight.* 2018;3(8):e98911.

45. Loos T, Dekeyser L, Struyf S, Schutyser E, Gijssbers K, Gouwy M, et al. TLR ligands and cytokines induce CXCR3 ligands in endothelial cells: enhanced CXCL9 in autoimmune arthritis. *Laboratory Investigation*. 2006;86:902.
46. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*. 2014;32:659-702.
47. Anspach L, Unger RE, Brochhausen C, Gibson MI, Klok HA, Kirkpatrick CJ, et al. Impact of polymer-modified gold nanoparticles on brain endothelial cells: exclusion of endoplasmic reticulum stress as a potential risk factor. *Nanotoxicology*. 2016;10(9):1341-50.
48. Banquy X, Suarez F, Argaw A, Rabanel J-M, Grutter P, Bouchard J-F, et al. Effect of mechanical properties of hydrogel nanoparticles on macrophage cell uptake. *Soft Matter*. 2009;5(20):3984-91.
49. Sans M, Panés J, Ardite E, Elizalde JJ, Arce Y, Elena M, et al. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology*. 1999;116(4):874-83.
50. Alinovi R, Goldoni M, Pinelli S, Campanini M, Aliatis I, Bersani D, et al. Oxidative and pro-inflammatory effects of cobalt and titanium oxide nanoparticles on aortic and venous endothelial cells. *Toxicology in Vitro*. 2015;29(3):426-37.
51. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(4):a000034-a.
52. Grabowski N, Hillaireau H, Vergnaud J, Santiago LA, Kerdine-Romer S, Pallardy M, et al. Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;454(2):686-94.
53. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016.
54. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international*. 2013;2013:942916-.
55. Khanna P, Ong C, Bay B, Baeg G. Nanotoxicity: an interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. *Nanomaterials*. 2015;5(3):1163-80.
56. Platel A, Carpentier R, Becart E, Mordacq G, Betbeder D, Nessler F. Influence of the surface charge of PLGA nanoparticles on their in vitro genotoxicity, cytotoxicity, ROS production and endocytosis. *Journal of Applied Toxicology*. 2016;36(3):434-44.
57. Yu M, Huang S, Yu KJ, Clyne AM. Dextran and polymer polyethylene glycol (PEG) coating reduce both 5 and 30 nm iron oxide nanoparticle cytotoxicity in 2D and 3D cell culture. *Int J Mol Sci*. 2012;13(5):5554-70.
58. Seok SM, Kim JM, Park TY, Baik EJ, Lee SH. Fructose-1,6-bisphosphate ameliorates lipopolysaccharide-induced dysfunction of blood-brain barrier. *Archives of pharmacological research*. 2013;36(9):1149-59.
59. Simon F, Fernández R. Early lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species production evokes necrotic cell death in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of hypertension*. 2009;27(6):1202-16.
60. Matsubara T, Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *The Journal of Immunology*. 1986;137(10):3295-8.
61. Turabekova M, Rasulev B, Theodore M, Jackman J, Leszczynska D, Leszczynski J. Immunotoxicity of nanoparticles: a computational study suggests that CNTs and C60

fullerenes might be recognized as pathogens by Toll-like receptors. *Nanoscale*. 2014;6(7):3488-95.

62. Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, et al. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occupational and environmental medicine*. 2007;64(9):609-15.

63. Krüger K, Schrader K, Klempt M. Cellular Response to Titanium Dioxide Nanoparticles in Intestinal Epithelial Caco-2 Cells is Dependent on Endocytosis-Associated Structures and Mediated by EGFR. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. 2017;7(4):79.

64. Liu X, Xue Y, Ding T, Sun J. Enhancement of proinflammatory and procoagulant responses to silica particles by monocyte-endothelial cell interactions. *Particle and fibre toxicology*. 2012;9:36.

ANNEXE 2: INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES ARTICLE 2

Supplemental material

PEG length of PLA-PEG nanoparticles modulates nanoparticle interactions with endothelial cells: effects on inflammatory responses and ROS production

Soudeh F. Tehrani^{1,2}, Samuel Legeay², Jean-Michel Rabanel⁴, Jérôme Cayon³, Jérémie Riou², Patrick Saulnier², Sylvie Marleau¹, V. Gaëlle Roullin¹, Patrice Hildgen¹, Guillaume Bastiat²

Chemical Materials & Reagents

Dichloromethane (CH_2Cl_2) anhydrous $\geq 99.8\%$, (containing 40-150 ppm amylene as stabilizer), calcium hydride (CaH_2), 3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione (lactide) (LA), methoxy polyethylene glycol (mPEG-OHs with PEG: (1, 2, 5 and 10 kDa), 1,8-diazabicyclo (5.4.0) undec-7-ene 98% (DBU), 1-pyrenebutanol, benzyl alcohol anhydrous, 99.8% and Pluronic®F68, Chloroform-d, 99.8 atom % D and deuterium oxide, 99.9 atom % D containing 1% (w/w) of 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, QC, Canada). Acetone HPLC Plus $\geq 99.9\%$ was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Endotoxin-free MilliQ water was purified by Millipore Polisseur Biopak® filter (Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

Immortalized mouse brain endothelial cell line bEnd.3 (ATCC® CRL-2299™) was purchased from Cedarlane (Burlington, ON, Canada). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (EGM-2, cryo amp, Pooled Cells), optimized culture medium for HUVECs (EGM™ BulletKit™), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with high glucose concentration 4.5 g/L and L-glutamine, non-essential amino acid solution (100×) without L-glutamine (NEAA) and DPBS- 1X without Ca^{++} and Mg^{++} were purchased from Lonza (Verviers, Belgium). Antibiotic antimycotic solution (100×), stabilized with 10,000 units penicillin, 10 mg streptomycin and 25 μg amphotericin B per mL, MTT Reagent Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and Bradford Reagent (0.1-1.4 mg/mL protein) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Gibco® Fetal Bovine Serum (FBS) was purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France).

Synthesis and characterization of polyethylene glycol-poly (lactic acid) diblock copolymer

Prior syntheses, D, L-lactide (LA) was purified twice by recrystallization in dry toluene. mPEG_x-OHs were dried in toluene by azeotropic distillation at atmospheric

pressure. After purification, monomers were pre-dried under vacuum overnight. DBU was dried over CaH_2 and then was filtered on a PTFE filter (0.45 μm , Millipore).

PLA-PEG_x diblock copolymers and PLA-Benzyl ester were synthesized by ring-opening polymerization initiated by DBU catalyst. Briefly, LA (0.04 mol) and benzyl alcohol (3.6×10^{-4} mol) or mPEG_x-OH with various PEG length (mPEG_{1kDa}-OH (1.66×10^{-4} mol), mPEG_{2kDa}-OH (1.14×10^{-4} mol), mPEG_{5kDa}-OH (1.2×10^{-4} mol), mPEG_{10kDa}-OH (6.97×10^{-5} mol)) were solubilized in 50 mL of anhydrous dichloromethane. DBU was added into this mixture at a ratio of 1% mol relative to LA. Polymerization reaction occurred at room temperature, under an argon atmosphere and moderate magnetic stirring for one hour. The polymerization reaction was then stopped by adding benzoic acid (1% mol relative to LA). Dichloromethane volume was reduced by rotary evaporation. The PLA-Benzyl ester and PLA-PEG_x polymers were precipitated into methanol or a mixture of methanol/water (70/30 v/v), 3 times respectively. The white polymer was dried under vacuum and stored in dry conditions at -20°C.

The chemical composition of polymers was characterized by ^1H NMR. PLA-Benzyl ester and PLA-PEG_x polymers were dissolved in DMSO- d_6 or CDCl_3 , respectively and then analyzed with Bruker Advanced 400 MHz spectrometers (Bruker, Germany). NMR data processed by using TOPSPIN 3.5 PL5 software (Bruker Billerica, MA, USA).

^1H NMR characterization of PLA-PEG_x (x: 1, 2, 5 and 10 kDa): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.5 (m, 3H, CH_3), 3.3 (s, 3H, CH_3), 3.65 (m, 2H, CH_2), 5.1 (m, 1H, CH).

^1H NMR characterization of PLA-BZ: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.5 (m, 3H, CH_3), 4.7 (m 2H, CH_2), 5.1 (m, 1H, CH), 7.3 (m, 5H, benzylic).

The number-average (M_n) and molecular weight-average (M_w) and polydispersity indexes (PDI) of polymers in tetrahydrofuran (THF) were acquired by gel permeation chromatography (Waters liquid chromatography system equipped with a refractive index detector, GPC columns) (Styragel 5 μm , Phenomenex, USA). Chromatographic data were collected and processed by Breeze II software (Waters Corp., Milford, MA). The flow rate was regulated at 1 mL/min and the column temperature was set at 40 °C. The calibration curves were based on linear polystyrene standards (M_w 600– 400000 g/mol) in THF.

Table S 1 : Chemical ratios as well as characteristics obtained for PLA-PEG_x (X: 1, 2, 5 or 10 kDa)

Batch	LA : PEG mol/mol	PEG (w/w%)	¹ H NMR	GPC
			Mn (PLA-PEG) g×mol ⁻¹	PDI
PLA-BZ	166:1	-	12,000	1.12
PLA-PEG _{1kDa}	297 :1	4.5	22,400	1.25
PLA-PEG _{2kDa}	307 :1	8.3	24,000	1.25
PLA-PEG _{5kDa}	560:1	11	45,000	1.23
PLA-PEG _{10kDa}	853:1	14	71,000	1.20

Nanoparticle preparation and characterization

Briefly, diblock copolymers were dissolved in acetone. The diblock copolymer solutions with the following concentrations (w/v) were prepared in acetone: [PLA-PEG_{1kDa}] =1%, [PLA-PEG_{2kDa}] =2%, [PLA-PEG_{5kDa}] =1.5%, [PLA-PEG_{10kDa}] =1%. The copolymer solutions were injected at a constant flow rate of 1 mL/min in MilliQ water (volume ratio 1:3) under magnetic stirring. PLA-BZ NPs without surfactant (PLA-w/o-F68 NPs) were prepared by injecting [PLA-BZ] = 0.33% w/v in MilliQ water. PLA-BZ NPs with surfactant (PLA-w-F68 NPs) were prepared by injecting [PLA-BZ] =0.33% w/v in 1% (w/v) solution of Pluronic®F₆₈ in MilliQ water. The nanosuspensions were dialyzed, using dialysis membrane 50kDa (SpectraPor membranes, Spectra Laboratories, USA), against a 100-fold volume of Milli-Q water for 12 h, thrice. Additional purification and concentration of NPs were performed by using a polysulfone Minimate™ Tangential Flow Filtration with a pore size of 100 kDa (Pall Corporation) at a flow rate of 3.5 mL×min⁻¹. NP suspensions were concentrated between 3 to 5 times. The nanoparticle suspensions were sterilized by filtration on 0.2 µm sterile filter before all biological assays.

Hydrodynamic diameters (z-average, D_H), size polydispersity indexes (PDI) of NPs after purification were measured by photon correlation spectroscopy at a diffraction angle of 173° in Milli-Q water at 20°C (Malvern Zetasizer Malvern, Worcester, U.K.). NP ζ-potential values at 20°C were measured by Electrophoretic Mobility (Zetasizer, Malvern, Worcester, U.K.). NP suspensions (300 µL) were diluted with 900 µL of 1 mM NaCl prior to electrophoretic mobility measurements.

NP concentrations (mg/mL) were obtained by freeze-drying 500 µL of purified NP suspensions. NP suspension were placed in tared Eppendorf tubes and freeze-dried for 24-h. Tubes were weighted again after complete drying to obtain the NP weight.

Determination of PEG surface density was performed by ¹H NMR (AV400 Advanced, Bruker, Germany). Concentrated NPs (500 µL) were diluted in 500 µL D₂O. ¹H PEG was quantified in D₂O relative to the ¹H of the internal standard (3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt). PEG weight quantifications were conducted in reference to mPEG-OH 2 kDa calibration curve and an internal standard peak intensity. PEG surface density was expressed as the number of PEG chains per nm² of NP surface (1). PEG surface density was calculated according to equations in (S1-S8).

PEG surface density was calculated by means of ¹H NMR

PEG surface density, expressed as a number of PEG chains per nm² of NP surface and it was calculated according to the following equation:

(Equation S1)
$$R_c = \frac{D_H}{2}$$

Where R_c is the NP mean radius (nm), D_H is the NP mean hydrodynamic diameter (nm, DLS in number size distribution),

(Equation S8)
$$V_{NP} = \frac{R_c^3 \times 4 \times \pi}{3}$$

where V_{NP} is the mean volume of one nanoparticle (nm³)

(Equation S 3)
$$NP_w = \frac{V_{NP}}{10^{21}} \times \rho_P$$

where NP_w is the weight of a NP (g), ρ_p is the polymer density (g/cm³), i.e. 1.25 g/cm³ (2),

(Equation S 4)
$$N = \frac{W_{NP}}{NP_w}$$

where N is the number of NPs in suspension in the sample, W_{NP} is the total weight of NPs (g) determined by gravimetry,

$$\text{(Equation S 5)} \quad N_{PEG} = \frac{W_{PEG}}{M_W} \times N_A$$

where N_{PEG} is the number of PEG chains in the sample; W_{PEG} is the weight of PEG on the surface of NP (g, determined by NMR); M_w is the molecular weight of PEG chains ($\text{g} \times \text{mol}^{-1}$), N_A is the Avogadro's number

$$\text{(Equation S 6)} \quad S_{NP} = R_c^2 \times 4 \times \pi$$

where S_{NP} is the mean surface of NP_s (nm^2)

$$\text{(Equation S 7)} \quad S_T = S_{NP} \times N$$

where S_T is the total surface of NP_s in the sample (nm^2),

$$\text{(Equation S 8)} \quad \text{PEG surface density} = \frac{(N_{PEG})}{S_T(\text{nm}^2)}$$

where PEG surface density is expressed in PEG chain/ nm^2 .

Statistical analysis

Statistical analysis of cytotoxicity data: the normality of data distribution was confirmed by Q-Q plots, and the hypothesis of homoscedasticity between variances of all groups was not rejected using the Levene's test (p-value = 0.043). Then, the parametric ANOVA 1F test was performed between all the groups, followed by a *post-hoc* Dunnett's test for pairwise comparisons. Differences were considered significant for p-value lower than 0.05.

Statistical test for ROS data: the normality of data distribution was not confirmed by Q-Q plots. Then the non-parametric Kruskal–Wallis test was performed between all the groups, followed by a *post-hoc* Dunn's test for pairwise comparisons. Differences were considered significant for p-value lower than 0.05.

Statistical analysis for qPCR data: The non-parametric Kruskal–Wallis test was performed between all the groups as a function of PEG chain lengths, followed by a *post-hoc* Dunn's test for pairwise comparisons. The non-parametric Mann-Whitney U test was

performed between the groups at 6 and 24 h. Differences were considered significant for p-value lower than 0.05.

Cytotoxicity assays

Cell viability was determined by the MTT assay on bEnd.3 cells and HUVEC incubated with either PLA-w/o-F68, PLA-w-F68 or PLA-PEG_x NPs, at concentrations ranging from 12.5 to 1,000 µg/mL (**Figure S1**).

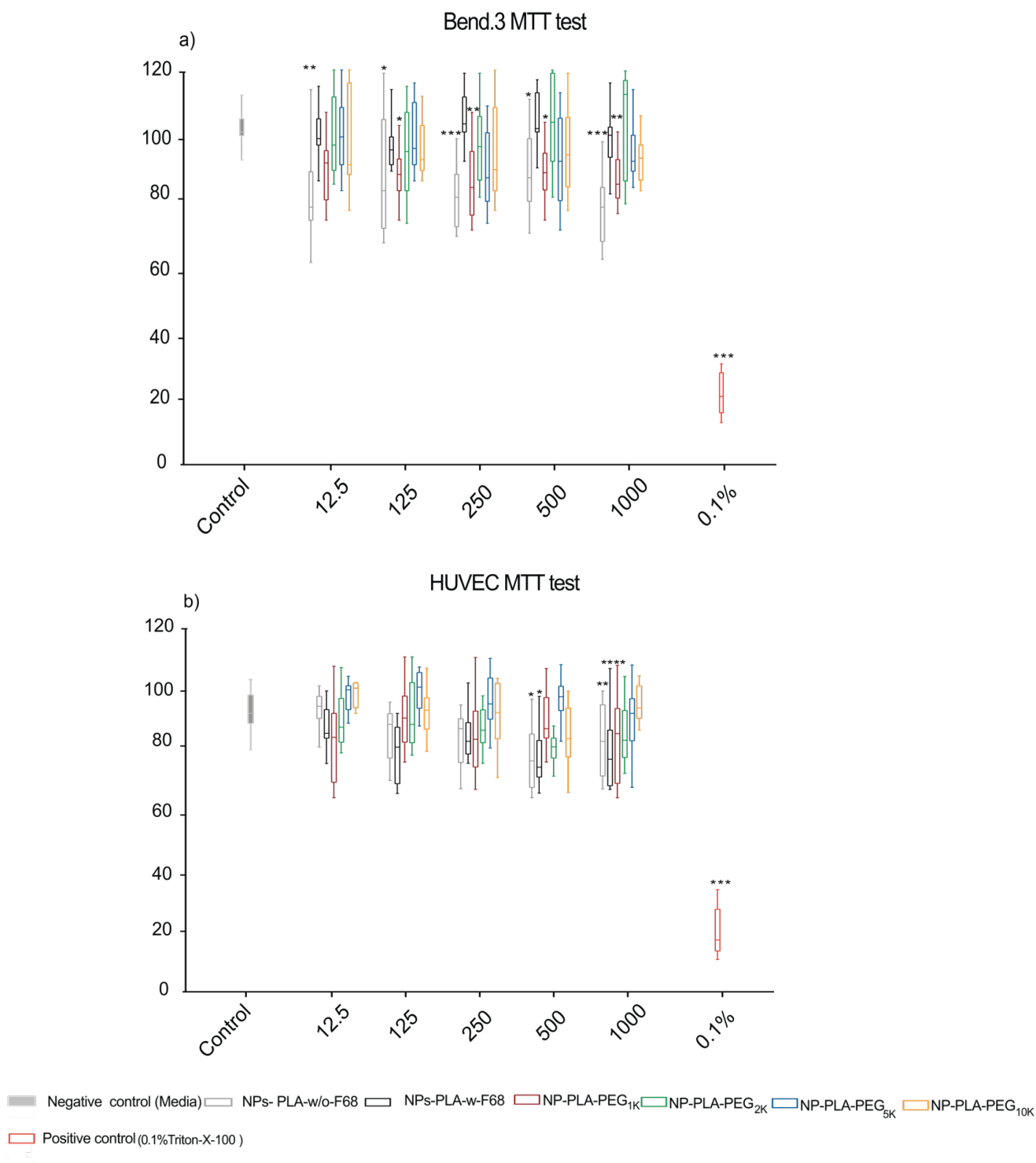


Figure S 1 : Cell viability of a) bEend.3 cells and b) HUVEC after 24-h exposure to PLA-w/o-F68, PLA-w-F68 and PLA-PEGx NPs at different concentrations. The box and whiskers display the median, lower and upper quartiles and confidence interval around the median; n= 4, 4 independent assays and quadruplicate wells per sample per assay). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Quantitative polymerase chain reaction of inflammatory cytokines and chemokines

The choice of studied inflammatory cytokines and chemokines as well as adhesion molecule and transcription factor gene expressions in response to NPs was guided by the importance of these proteins in the inflammation process and their ubiquitous involvement in these processes (3). The gene expressions of 24 cytokines and chemokines in bEnd.3 (Table S2) and in HUVEC (Table S3) were studied.

Table S 2 : List of mouse cytokines and chemokines studied by qPCR in bEnd.3 cells.

Cytokine		Medium	PLA-W-F68	PLA-PEG _{1kDa}	PLA-PEG _{2kDa}	PLA-PEG _{5kDa}	PLA-PEG _{10kDa}	LPS 0.2	LPS 1
IL-6		+	+	+	+	+	+	+	+
CXCL1		+	+	+	+	+	+	+	+
CXCL10		+	+	+	+	+	+	+	+
CXCL11	6-h	+	+	+	+	+	+	+	+
	24-h	±	-	-	-	-	-	-	-
CCL2		+	+	+	+	+	+	+	+
ICAM1		+	+	+	+	+	+	+	+
TIMP1		+	+	+	+	+	+	+	+
MCSF		+	+	+	+	+	+	+	+
NFkB1		+	+	+	+	+	+	+	+
NFkB3		+	+	+	+	+	+	+	+
TNF α		-	-	-	-	-	-	-	-
IL-1 α		-	-	-	-	-	-	-	-
IL-1 β		-	-	-	-	-	-	-	-
IL-2		-	-	-	-	-	-	-	-
IL-4		-	-	-	-	-	-	-	-
IL-10		-	-	-	-	-	-	-	-
IL-13		-	-	-	-	-	-	-	-
IL-17		-	-	-	-	-	-	-	-
CXCL9		-	-	-	-	-	-	-	-
CCL17		-	-	+	+	+	+	+	+
p28		-	-	-	-	-	-	-	-
p35		-	-	-	-	-	-	-	-
p40		-	-	-	-	-	-	-	-
IFN γ		-	-	-	-	-	-	-	-

+: Observed

-:Absence

± LE: Late expression (after 32cycles)

Table S 3 : List of human cytokines and chemokines studied by qPCR in HUVEC.

Cytokine		Medium	PLA-W-F68	PLA-PEG _{1kDa}	PLA-PEG _{2kDa}	PLA-PEG _{5kDa}	PLA-PEG _{10kDa}	LPS 0.2	LPS 1
IL-6		+	+	+	+	+	+	+	+
IL-1a		+	+	+	+	+	+	+	+
IL-1b		+	+	+	+	+	+	+	+
IL-12		+	+	+	+	+	+	+	+
CXCL1		+	+	+	+	+	+	+	+
CXCL10		+	+	+	+	+	+	+	+
CXCL11		+	+	+	+	+	+	+	+
CCL2		+	+	+	+	+	+	+	+
ICAM1	6-h	+	+	+	+	+	+	+	+
	24-h	±	-	-	-	-	-	-	-
TIMP1		+	+	+	+	+	+	+	+
MCSF		+	+	+	+	+	+	+	+
NFkB1		+	+	+	+	+	+	+	+
NFkB3		+	+	+	+	+	+	+	+
TNF α		-	-	-	-	-	-	-	-
IL-2		-	-	-	-	-	-	-	-
IL-4		-	-	-	-	-	-	-	-
IL-10		-	-	-	-	-	-	-	-
IL-13		-	-	-	-	-	-	-	-
IL-17		-	-	-	-	-	-	-	-
CCL17		-	-	-	-	-	-	-	-
p28		-	-	-	-	-	-	-	-
p35		-	-	-	-	-	-	-	-
p40		-	-	-	-	-	-	-	-
IFN γ		-	-	-	-	-	-	-	-

+: Observed

- :Absence

± LE: Late expression (after 32 cycles)

Table S 4: Main functions of inflammatory cytokines and chemokines expressed in bEnd.3 cells and HUVEC.

Cytokines and Chemokines	Main function	Reference
IL-6	Pro-inflammatory (soluble IL-6) Anti-inflammatory (membrane bound interleukin-6)	(4)
IL-1α	Pro-Inflammatory cytokine	(5)
IL-1β	Pro-Inflammatory cytokine	(5)
IL-12	Responsible for the generation of Th1 T cells	(6)
CXCL1	Neutrophil trafficking	(7)
CXCL10	Th1 response, CD8, Natural killer (NK) cells trafficking	(7)
CXCL11	Th1 response, CD8, Natural killer (NK) cells trafficking	(7)
CCL2	Inflammatory monocyte trafficking	(7)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1 Adhesion and transmigration of leucocytes on the vascular endothelial cells	(8)
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor	(9)
TIMP-1	Regulation of local inflammatory processes	(10)
NFKB₁/NFKB₃	Regulation of: - Innate- and adaptive-immune responses inflammation - Cellular-stress response and tissue remodelling	(11)

The relative Quantification (RQ) of mRNA expression for TIMP-1, NFKB1 and NFKB3 in bEnd.3 cells which were treated with NPs and LPS were found lower than 2 fold, which was below the detection threshold of q-PCR (**Figure S2**). Since, these expressions gene were too low to be considered as a detectable response.

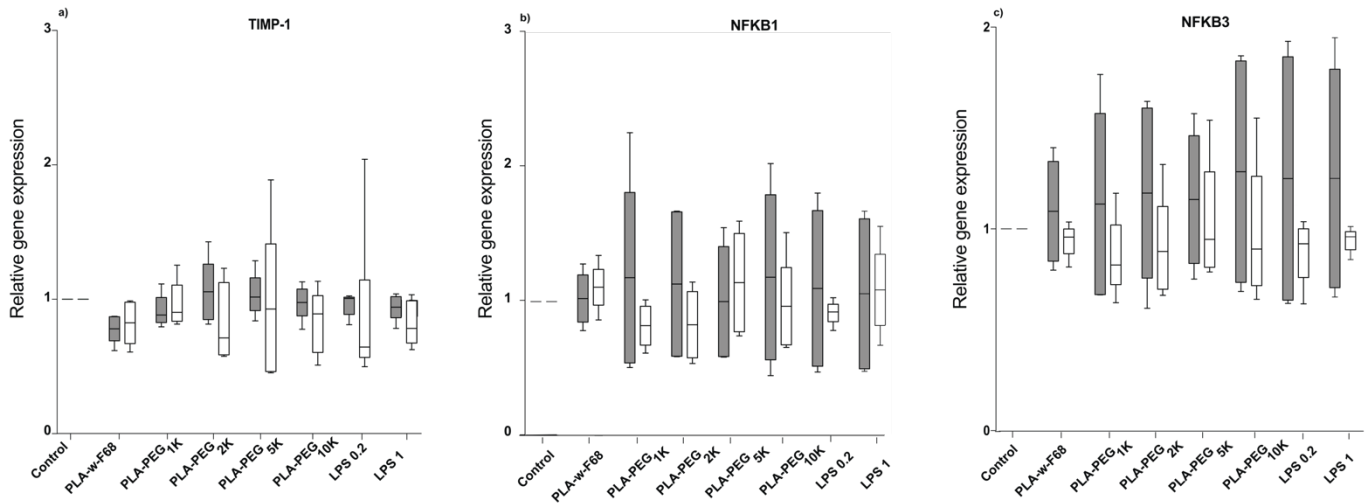


Figure S 2 : Relative mRNA expression of a: TIMP-1; b: NFKB1 and c: NFKB3 in bEnd.3 cells treated with PLA-PEG_x, PLA-w/o-F68, PLA-w-F68 NPs and LPS for 6-h (grey bars) and 24-h (white bars). n= 4 independent samples. No statistical differences were observed between groups.

The mRNA expression of IL-12, M-CSF, ICAM, TMP1 and NFKB1 in HUVEC incubated with NPs and LPS were lower than 2 folds (**Figure S3**). Therefore, these expressions gene were too low to be considered as a detectable response.

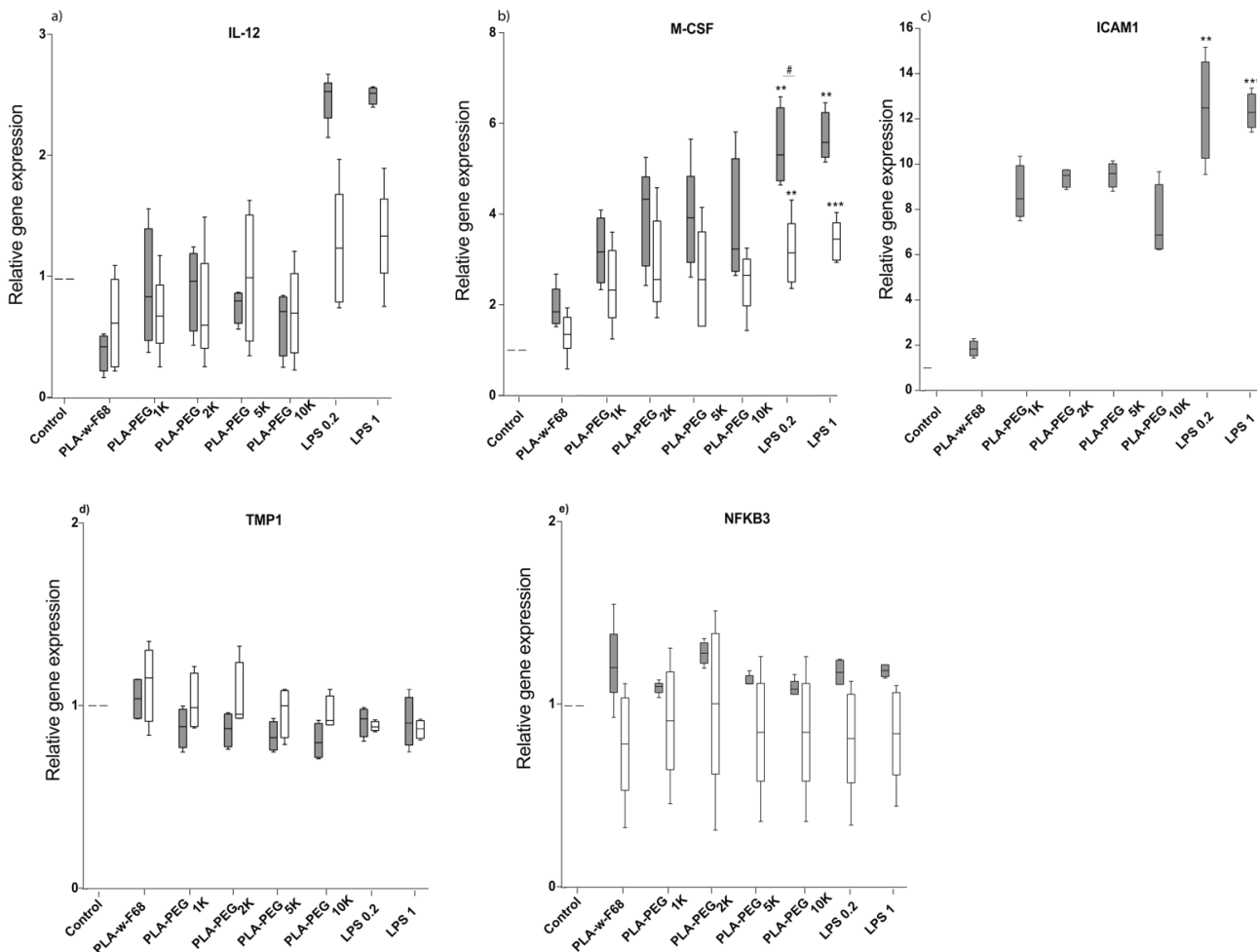


Figure S 3: Relative mRNA expression of a: IL-12; b: M-CSF; c: ICAM1, d: TMP1 and e: NFKB3 in HUVEC treated with PLA-PEG_x, PLA-w/o-F68, PLA-w)-F68 NPs and LPS for 6-h (grey bars) and 24-h (white bars). n= 4 independent samples. No statistical differences were observed between groups.

Comparison of gene expression pattern between bEnd.3 cells and HUVEC.

The expressions of inflammatory cytokines and chemokine in bEnd.3 cells and HUVEC were displayed in same panel to make the comparison of gene expressions easy, in bEnd.3 cells and HUVEC (**Figure S4 a-c**). The expressions of inflammatory cytokines and chemokine in bEnd.3 and HUVEC as shown in the **Figure S4 a-c** generally overlap in terms of pattern and timing of expression.

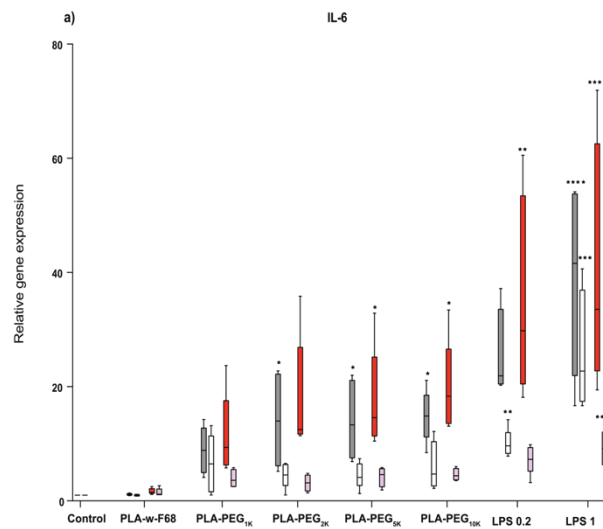


Figure S 4 (a): Comparison of relative mRNA expression of a): IL-6 for bEnd.3 cells treated with NPs and LPS for 6- h (grey bars) and 24-h (white bars) and HUVEC treated with NPs and LPS for 6-h (red bars) and 24-h (pink bars). n= 4 independent samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

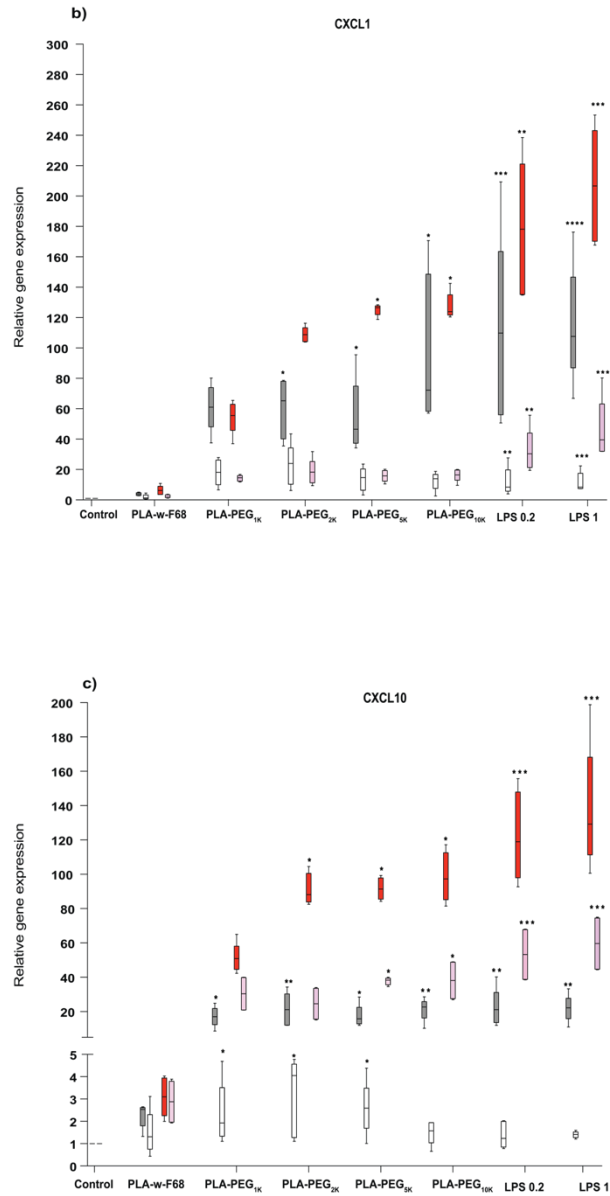


Figure S4 (b-c): Comparison of relative mRNA expression of b): CXCL1; c) CXCL10 for bEnd.3 cells treated with NPs and LPS for 6- h (grey bars) and 24-h (white bars) and HUVEC treated with NPs and LPS for 6-h (red bars) and 24-h (pink bars). n= 4 independent samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

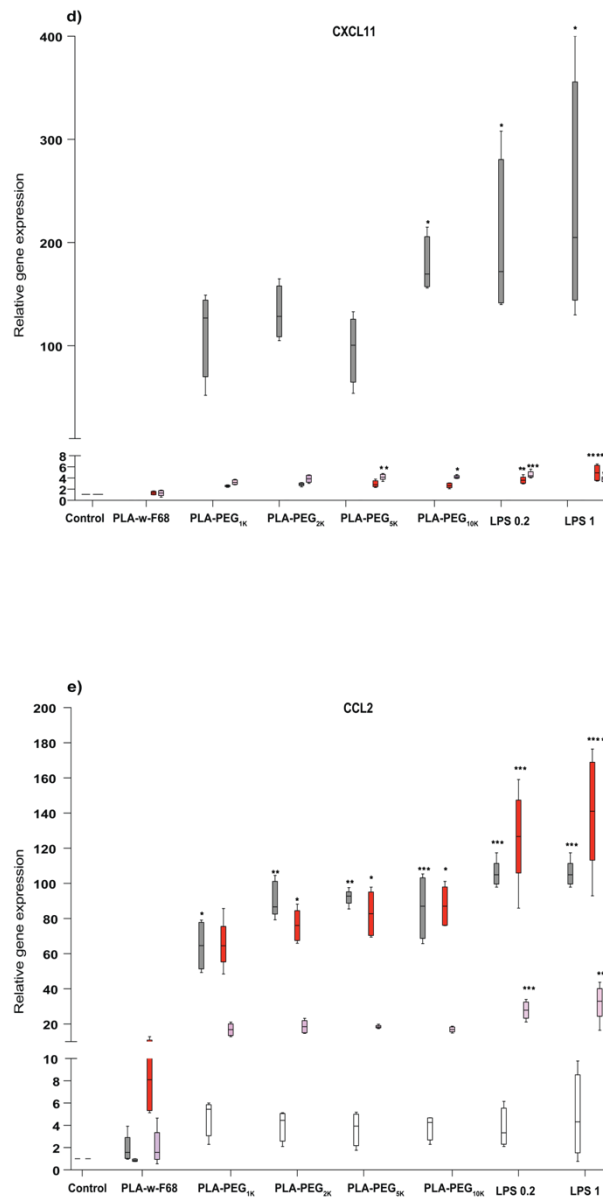


Figure S 4 (d-e): Comparison of relative mRNA expression of d): CXCL11; c): CCL2 for bEnd.3 cells treated with NPs and LPS for 6- h (grey bars) and 24-h (white bars) and HUVEC treated with NPs and LPS for 6-h (red bars) and 24-h (pink bars). n= 4 independent samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$

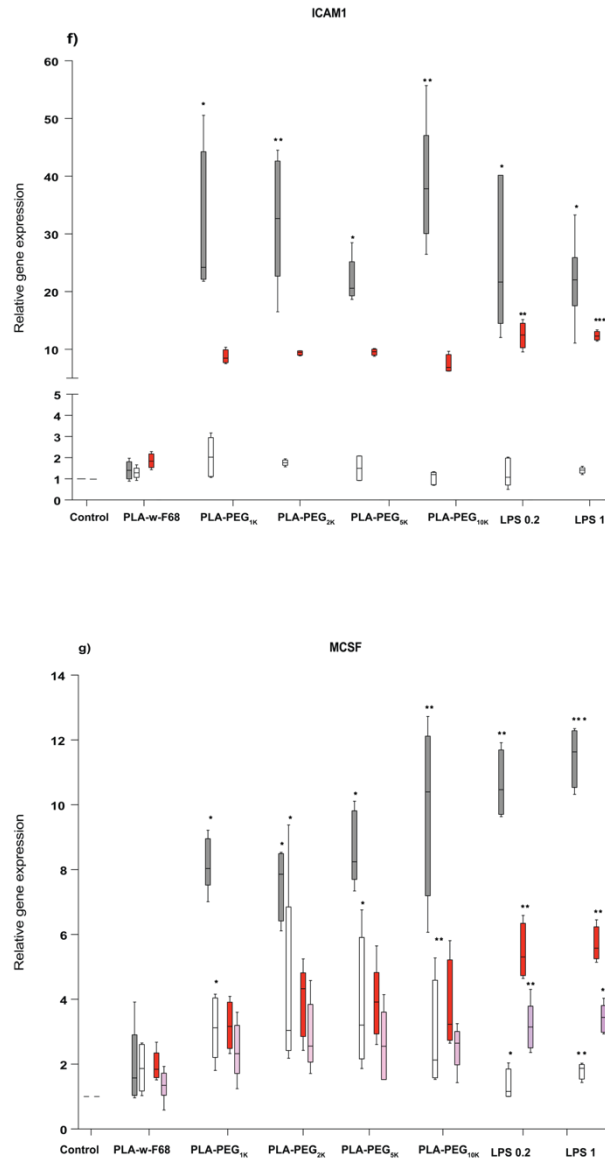


Figure S4 (f-g): Comparison of relative mRNA expression of f): ICAM1; g): MCSF for bEnd.3 cells treated with NPs and LPS for 6- h (grey bars) and 24-h (white bars) and HUVEC treated with NPs and LPS for 6-h (red bars) and 24-h (pink bars). n= 4 independent samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

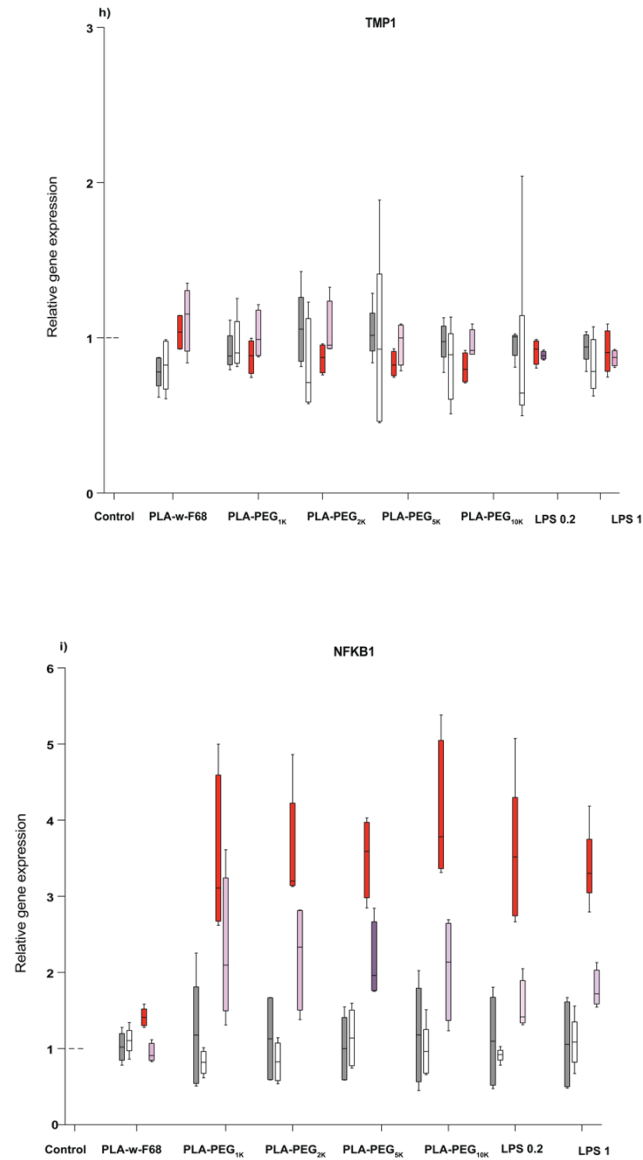


Figure S 4 (f-g): Comparison of relative mRNA expression of f): TMP1; g): NFKB1 for bEnd.3 cells treated with NPs and LPS for 6- h (grey bars) and 24-h (white bars) and HUVEC treated with NPs and LPS for 6-h (red bars) and 24-h (pink bars). n= 4 independent samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

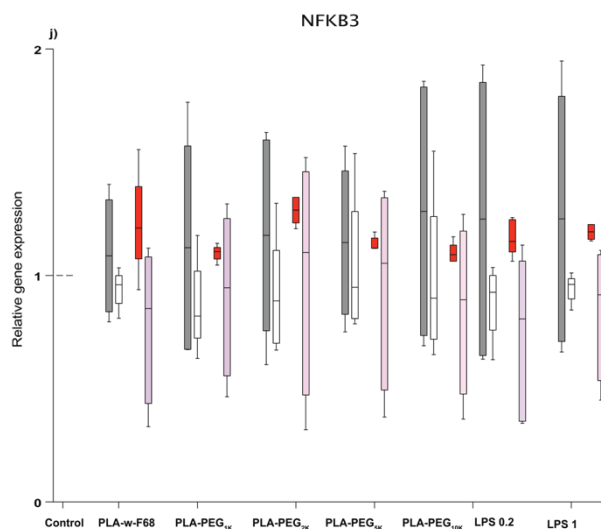


Figure S 4 (j): Comparison of relative mRNA expression of j): NFKB3 for bEnd.3 cells treated with NPs and LPS for 6- h (grey bars) and 24-h (white bars) and HUVEC treated with NPs and LPS for 6-h (red bars) and 24-h (pink bars). n= 4 independent samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$

Intracellular reactive oxygen species (ROS) quantifications

Reactive oxygen species generation in bEnd.3 cells and HUVECs incubated with PLA-w/o-F68, PLA-w-F68 or PLA-PEG NPs, at different concentrations (12.5 to 1,000 $\mu\text{g/mL}$) was quantified at 6-h and 24-h post-treatment (**Figure S5**).

References Annexe 2

1. Rabanel J-M, Faivre J, Tehrani SF, Lalloz A, Hildgen P, Banquy X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG–PLA Nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7(19):10374-85.
2. Rabanel J-M, Faivre J, F.Tehrani S, Lalloz A, Hildgen P, Banquy X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG–PLA Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(19):10374-85.
3. Vishwakarma A, Bhise NS, Evangelista MB, Rouwkema J, Dokmeci MR, Ghaemmaghami AM, et al. Engineering Immunomodulatory Biomaterials To Tune the Inflammatory Response. *Trends in Biotechnology*. 2016;34(6):470-82.
4. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011;1813(5):878-88.
5. Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1alpha and the inflammatory process. *Nature immunology*. 2016;17(8):906-13.
6. Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8(1):40-52.
7. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*. 2014;32:659-702.
8. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet (London, England)*. 1998;351(9096):88-92.
9. Popova A, Kzhyshkowska J, Nurgazieva D, Goerdts S, Gratchev A. Pro- and anti-inflammatory control of M-CSF-mediated macrophage differentiation. *Immunobiology*. 2011;216(1-2):164-72.
10. Bugno M, Witek B, Bereta J, Bereta M, Edwards DR, Kordula T. Reprogramming of TIMP-1 and TIMP-3 expression profiles in brain microvascular endothelial cells and astrocytes in response to proinflammatory cytokines. *FEBS Letters*. 1999;448(1):9-14.
11. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8:49.

5 Discussion et conclusion

5.1 Mise en contexte

Durant cette thèse nous avons étudié l'effet de la longueur des chaînes de PEG de surface sur les interactions des NPs avec les cellules endothéliales vasculaires. Les interactions avec les cellules endothéliales vasculaires ont été étudiées à deux niveaux: 1) l'efficacité d'internalisation ou de transcytose des NPs à travers un modèle de BHE; 2) le potentiel d'induction d'une réponse inflammatoire dans les cellules endothéliales vasculaires par ces NPs.

Tel qu'il a été montré par les résultats de l'article « 1 » les taux d'endocytose et de transcytose augmentent avec la longueur des chaînes de PEG, jusqu'à l'atteinte d'un plateau à partir du PEG 5kDa. Par contre, en ce qui concerne l'induction de la réponse inflammatoire, aucune différence significative n'a été observée entre les différentes longueurs des chaînes de PEG (article « 2 »). Cependant la présence de PEG attaché à la surface des NPs lors d'une exposition aiguë induit une augmentation transitoire de certains marqueurs de l'inflammation, avant une résolution rapide et un retour aux niveaux basaux.

5.2 La synthèse de polymère

La synthèse d'une bibliothèque de diblocs PLA-PEG ayant différentes longueurs de chaînes de PEG est une étape critique pour étudier les interactions des NPs avec des cellules. Les synthèses de diblocs peuvent être effectuées soit par réaction de couplage entre les deux blocs, soit par la polymérisation en ouverture de cycle en utilisant le PEG comme macroinitiateur. En premier lieu, la réaction de couplage a été choisie pour sa facilité à mettre en application. De plus, dans plusieurs articles publiés par les équipes réputées dans le domaine des NPs pharmaceutiques, les diblocs PLA-PEG_x ont été synthétisés par des réactions de couplage (1, 2). L'efficacité de la réaction de couplage entre les chaînes de PLA et de PEG que nous avons obtenu était faible, de l'ordre de 30 à 45%. Outre ce rendement modeste, se pose le problème de la séparation des diblocs formés des chaînes de PLA et PEG n'ayant pas réagi. Étant donné que dans le cas des petites molécules, ces mêmes réactions de couplage fonctionnent efficacement et avec un rendement élevé, l'efficacité de cette voie de synthèse pour les polymères est rarement

mise en question. Peu d'études ont rapporté l'efficacité de la réaction de couplage de PLA-PEG. Un article publié en 2012 mentionne que l'efficacité de la réaction de couplage pour le PEG 2kDa avec du PLGA ne dépassait pas 30 % (3). Dans la mesure où la réaction de couplage n'est pas très efficace, nous avons synthétisé la bibliothèque de diblocs par la polymérisation par ouverture du cycle (POC) à température ambiante en présence de DBU. En minimisant la présence des impuretés (surtout H₂O) qui peuvent initier la réaction de polymérisation, cette voie de synthèse nous a permis de synthétiser des diblocs PLA-PEG_x monodisperse et avec un taux élevé d'insertion du PEG. Cette voie de synthèse permet également de contrôler la taille des blocs hydrophobes et en conséquence nous avons pu contrôler le contenu massique de PEG en pourcentage de poids de polymère.

Ce pourcentage massique de polymère est important pour obtenir des NPs avec des propriétés physiques similaires (agrégat micellaire vs NPs solide). Les contenus de PEG supérieur à environ 10-15% forme des agrégats micellaires plutôt que des NPs solides (4). Également, un contenu élevé de PEG peut diminuer la stabilité physique et l'intégrité des NPs dans un milieu biologique complexe, comprenant les molécules organiques présentant des propriétés de surfactants (5).

La concentration des polymères dans la phase organique a été ajustée afin de normaliser la taille des NPs. La longueur des blocs hydrophobes et le contenu massique de PEG sont des paramètres importants qui influencent la taille des NPs (4, 6, 7). Nous avons étudié les propriétés de surface des NPs, il nous fallait donc choisir une sonde fluorescente qui reste à l'intérieur des NPs et qui ne modifie pas les propriétés de surface. Le pyrène-butanol a été choisi pour deux raisons : sa capacité à agir comme macroinitiateur pour former une chaîne de PLA par POC à partir de son groupe hydroxyle libre d'une part et d'autre part son hydrophobicité élevée, permettant un emprisonnement de la sonde dans le cœur de la NP.

5.3 Fabrication et purification des NPs

L'étape de purification des NPs est une étape plutôt négligée dans la littérature. Dans la plupart des articles, la dialyse a été utilisée en tant que seule technique de purification. De plus l'efficacité de la purification est rarement évaluée. Dans cette thèse, un accent particulier a été mis sur la purification des polymères et des NPs pour s'assurer

de l'élimination maximale des PEG non greffés. La densité de PEG est surestimée en présence de PEG libre. De plus, le PEG libre peut influencer les effets biologiques des NPs. La purification la plus efficace est effectuée au niveau des polymères. Ce qui a été effectué par précipitations successives et vérification du contenu en PEG par RMN (voir résultats article 1).

Tel que nous l'avons montré dans notre premier article, la dialyse seule n'est pas très efficace pour la purification des NPs surtout si le taux de PEG libre résiduel est élevé. La dialyse a donc été combinée avec la filtration tangentielle.

5.4 Caractérisation de la couche de PEG en surface

Plusieurs méthodes ont été appliquées pour quantifier le PEG en surface des NPs intactes. Une de ces méthodes est la RMN du proton de nanosuspension de PLA-PEG dans D₂O avec un standard interne (4, 8). Cependant la RMN du proton de nanosuspensions ne permet pas de distinguer entre PEG libre et PEG lié aux NPs. L'analyse par RMN peut être adaptée afin de déterminer le ratio entre le PEG attaché aux NPs et le PEG libre en basant sur leurs différences de coefficient de diffusion obtenu par la «Diffusion-ordered spectroscopy» ou DOSY. La spectroscopie DOSY a été utilisée pour déterminer la taille de NPs (9); pour déterminer la concentration micellaire critique des micelles de PLA-PEG (10) ou encore déterminer la fraction du ligand libre par rapport au ligand lié aux NPs (11). Cette technique n'est pas très utilisée pour le contrôle de l'efficacité de greffage ou d'absorption en surface de ligand associés à des NPs.

Le rapport massique entre les chaînes de PEG diffusant rapidement (PEG libre) et les chaînes de PEG avec un coefficient de diffusion lent (PEG attachés à la surface des NPs) diminue avec l'avancée de la purification des nanosuspensions. En dépit des différentes étapes de purification au niveau des polymères et des particules, un rapport final donne un taux d'environ 15% de PEG libre.

Cependant il est possible que cette quantité soit surestimée pour les raisons suivantes. Tout d'abord la quantité de chaînes de PEG associée aux NPs est sous-estimée du fait de la fraction de PEG piégée à l'intérieur des NPs et qui est donc invisible à la RMN. En effet, Rabanel *et al.* ainsi que Rode-Garcia *et al.* ont montré que des pourcentages

appréciables de PEG peuvent être piégés à l'intérieur (4, 12). Les unités de répétitions des chaînes de PEG ont différent degré de mobilité due à leur liaison à la surface de la particule. Le temps de relaxation varie avec la distance de la surface, menant à un élargissement du pic et une sous-estimation des chaînes de PEG en surface (13). Cet effet peut être aussi favorisé par la conformation en brosse de la couche de PEG, diminuant les temps de relaxation des unités de répétition.

Le pourcentage de PEG libre impacte le calcul de la densité de PEG. La soustraction des PEG libres résiduels de la quantité totale de PEG superficiel permet d'obtenir une valeur plus exacte de la densité de PEG. Bien que cette correction diminue la valeur de la densité de PEG, celle-ci ne modifie pas la conformation de la couche de PEG qui reste sous forme de brosse (voir résultats article «1» et «2»). L'ajustement de la densité de PEG n'introduit pas une différence significative entre les différents lots de NPs.

5.5 Stabilité des nanosuspensions et effets biologiques

Malgré l'importance de la stabilité des NPs dans les milieux biologiques, cet effet est très peu étudié. La stabilité des nanosuspensions influence les interactions des NPs avec les cellules et aussi la biodistribution des NPs (14). Les résultats publiés dans l'article «1» démontrent que la stabilité colloïdale des NPs PLA sans revêtement de PEG dans un milieu salin ou dans le milieu contenant de la BSA mimant un milieu biologique, est très mitigée et conduit à une précipitation de la nanosuspension.

Dans les études s'intéressant aux effets biologiques de la surface des NPs, les particules non PEGylées ont été comparées avec les particules PEGylées. Cependant, dans la mesure où les particules non-PEGylées ne sont pas stables en milieu biologique, les différences observées ne peuvent pas être attribuées à la seule influence de la couche de PEG. Ce type d'effet peut être observé dans les études montrant que la diffusion des NPs PEGylées injectées directement dans le cerveau de souris par voie intracrânienne est favorisée en comparaison avec leurs homologues non-PEGylées (15). Il a également été démontré *in vitro* que l'internalisation des NPs non-PEGylées est plus importante que l'internalisation de leurs homologues PEGylées. Dans ces études, la possibilité que les résultats soient biaisés par les phénomènes d'agrégation était négligée (16). La stabilité limitée des NPs non-PEGylées rend leur utilisation en tant que contrôle négatif

problématique, autant dans les études d'internalisation de l'article «1» que dans les études d'inflammation dans l'article « 2 ».

5.6 Interactions avec le vivant : « l'interface nanobio »

5.6.1 Modèle de transcytose de BHE *in vitro*

Le choix d'un modèle approprié pour étudier l'endocytose et la transcytose des NPs vers le SNC est un défi. Il existe différents modèles de BHE *in vitro*. Le choix d'un modèle de BHE est surtout déterminant pour l'étude de la transcytose où, la monocouche de cellules endothéliales théoriquement doit bloquer tout passage paracellulaire des macromolécules et des NPs. Trois aspects sont importants à considérer lors de ce choix : 1) le choix de ou des lignées cellulaires, particulièrement la lignée endothéliale vasculaire; 2) le choix d'un système comportant une seule lignée cellulaire (seulement une lignée endothéliale) ou plusieurs lignées (pour mieux refléter la réalité de la BHE; 3) le choix d'un système statique (type insert sur plaque) ou dynamique (avec une circulation du milieu).

La souche cellulaire bEnd.3 est reconnue pour former une monocouche imperméable aux macromolécules. De plus, la comparaison entre les cellules bEnd.3 et les cellules primaires murines ne montrent pas d'avantages significatifs des cellules primaires pour l'étude du transport des macromolécules (17), même si les bEND.3 présentent une perméabilité supérieure aux petites molécules (18). Finalement, l'utilisation de cellules immortalisées provenant de souris est plus accessible et plus facile à mettre à pratique du fait de leur commercialisation.

Il existe différents modèles *in vitro* de BHE, tels que les monocultures de cellules endothéliales, ou les co-cultures de cellules endothéliales-astrocytes, de cellules endothéliales-péricytes, ou encore de modèles tricultures cellulaires endothéliales-péricytes-astrocytes (19). Les co-cultures de cellules bEnd.3-astrocytes ne montrent pas une diminution significative de la perméabilité au Dextran-FTIC 10 et 70 kDa en comparaison avec la monoculture de bEnd.3 (20). La présence de péricytes ou de milieu conditionné avec les péricytes diminue la perméabilité du modèle de BHE au Dextran-FTIC 70 kDa (21). L'ajout des péricytes à un modèle monoculture de cellules endothéliales

ou co-cultures de cellules endothéliales-astrocytes réduit également la perméabilité à la fluorescéine sodique (22). La mise au point d'un modèle pluricellulaire est complexe et demande beaucoup d'ajustements pour des bénéfices plutôt limités au niveau de l'amélioration de la perméabilité. Étant donné que notre étude porte sur la comparaison de l'efficacité de la transcytose en fonction de la longueur des chaînes de PEG (article «1»), notre principal effort devait être dirigé sur l'élimination du passage paracellulaire pour isoler efficacement l'effet du passage intracellulaire des NPs, la transcytose.

Dans la mesure où la monocouche de bEnd.3 est bien formée, le passage paracellulaire est négligeable (voir SI de article «1»). En prenant en considération tous les points mentionnés ci-dessus, le modèle de bEnd.3 est un bon modèle pour étudier la transcytose des NPs. Le modèle de cellules murines immortalisées (bEnd.3) sous forme de monocouche installée dans un système statique a donc été retenu.

De manière générale les systèmes *in vitro* ont certaines limitations vis-à-vis des conditions que l'on retrouve *in vivo*. Dans un organisme vivant la transcytose d'une particule à travers la BHE (ou toute autre barrière cellulaire) est le résultat de plusieurs phénomènes: 1) le temps de circulation dans la circulation, la probabilité de transcytose augmentant avec le temps; 2) la capacité à s'approcher et se lier à la surface de la paroi vasculaire en régime dynamique, sous l'effet de la circulation sanguine; 3) l'efficacité de l'endocytose et la voie d'endocytose utilisée. L'effet de la couche de PEG pourrait affecter la transcytose en affectant tant la durée de vie en circulation (en affectant les niveaux d'opsonisation), que les interactions avec les parois des capillaires sanguins, ou que l'endocytose et les voies de trafic intracellulaire permettant l'évitement de la voie lysosomale et favorisant l'exocytose (23).

Même si les cellules endothéliales de la BHE jouent un rôle important dans la perméabilité de BHE, la structure anatomique de la BHE est bien plus complexe qu'une simple monocouche de cellules endothéliales. Les péricytes et astrocytes jouent un rôle dans la perméabilité de la BHE *in vivo*, tant au point de vue anatomique que de la sécrétion de facteurs régulant les transports, des effets mal reproduits *in vitro* (19). De plus, la présence de membrane basale qui est un réseau bien organisé de protéines présentes dans la matrice extracellulaire pourrait contrôler la diffusion NPs vers le tissu cérébral après la

translocation à travers les cellules endothéliales. L'effet de la couche de PEG pourrait aussi influencer la diffusion des NPs à travers la membrane basale.

Les résultats obtenus avec le modèle de monocouche en mode statique que nous avons choisi, n'apporte qu'une réponse partielle à l'élucidation du rôle de la longueur de chaîne de PEG sur la transcytose.

5.6.2 Endocytose et transcytose de BHE *in vitro*

5.6.2.1 Rôle de la présence de sérum dans les milieux

L'objectif de l'article «1» est de mettre en évidence l'effet de la longueur de la chaîne de PEG en surface de NPs. L'adsorption des protéines présentes dans le sérum pourrait normaliser la surface des NPs et en conséquence dissimuler l'effet de la longueur de la chaîne de PEG. Les expériences d'endocytose et de transcytose ont donc été effectuées dans un milieu sans sérum.

Le choix des expériences en milieu sans sérum a été encouragé par plusieurs considérations:

- Le modèle bEnd.3 développé en absence de sérum présente, une amélioration de l'expression de claudin-5 et zonula occludens-1. L'augmentation de l'expression des protéines des jonctions serrées diminue la perméabilité du modèle (24).
- Guarnieri et ses collaborateurs ont démontré que l'adsorption des protéines de sérum à la surface des NPs polystyrène sans revêtement influence la cinétique d'internalisation des NPs, mais n'aurait pas de rôle majeur sur les mécanismes d'endocytose et le trafic intracellulaire des NPs (25).

Cependant il faut être conscient des différences entre les conditions expérimentales et la situation *in vivo*. Étant donné que les résultats ont été obtenus dans un contexte sans sérum, les implications de ces résultats à une situation physiologique dans laquelle les NPs sont exposées au sérum ne sont pas claires.

5.6.2.2 Les voies d'endocytose

Nous avons démontré que les voies des clathrines et la macropinocytose sont les deux voies principales d'endocytose de NPs PLA-PEG_x tandis que l'inhibition de la voie

cavéolaire n'impacte pas le taux d'endocytose d'aucun groupe de NPs, indépendamment de la longueur de la chaîne de PEG. Dans la mesure où aucun inhibiteur n'est complètement spécifique, il faut nuancer l'interprétation des résultats de l'inhibition des voies d'endocytose par des molécules chimiques (26). En effet, ceux-ci peuvent avoir un effet d'inhibition partiel ou encore avoir des effets indirects sur les autres voies d'endocytose. Il ne faut pas oublier qu'il existe également des voies endocytose cavéole et clathrine indépendantes qui sont encore très peu étudiées et qui peuvent contribuer au résultat final.

5.6.2.3 La transcytose

Bien que n'inhibant pas l'endocytose, la genistéine, l'inhibiteur de la voie cavéolaire a pour effet de diminuer la transcytose des NPs PEGylée surtout les NPs PLA-PEG₁₀₀₀₀. Ce phénomène est difficile à expliquer, mais nous pouvons penser que la genistéine pourrait perturber le transport intracellulaire ou l'exocytose des NPs.

La macropinocytose joue un rôle central sur la transcytose des NPs ayant des chaînes de PEG plus grandes que 5kDa. La macropinocytose n'est pas reconnue en tant qu'une voie typique menant au transport à travers la BHE ou d'autres barrières endothéliales (27). La voie de la macropinocytose a été cependant associée à l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans le cerveau (28). La transcytose par la voie macropinocytose est également liée au passage de nanotubes de carbone dans un modèle BHE *in vitro* (29).

L'effet de la longueur des chaînes de PEG (PEG>1kDa) sur la transcytose n'est pas dû à une différence dans stabilité colloïdale des différents lots de NPs (Figure 3.2). Il n'est pas dû non plus à une différence dans la composition de la couronne protéique, car les essais ont été conduits en absence de sérum. Une hypothèse qui peut être émise est que la longueur des chaînes de PEG affecte les propriétés mécaniques de la NP. En effet la température de transition vitreuse (*T_g*) des différents lots de NP diminue avec l'augmentation de la longueur de PEG. Ce qui peut affecter la voie d'entrée dans la cellule. Cependant tout ceci ne constitue encore que des indices et des résultats préliminaires. Des études complémentaires seront nécessaires pour élucider cet effet.

Les niveaux de transcytose à travers de BHE *in vivo* rapportés pour les particules PEGylées qui ne possèdent pas de ligand de ciblage sont très faibles. Par exemple, Calvo *et al* ont montré que l'accumulation des NPs de poly(hexadecyloxyacrylate) PEGylées (PEG 2kDa) dans le cerveau est de l'ordre de moins de 0.005% de la dose injectée par gramme de tissus (30). L'ajout de ligand de ciblage tel que la transferrine ou le folate ne permet cependant qu'une augmentation modeste de l'accumulation dans le cerveau de l'ordre de <0.1% (31, 32), bien que certaines études ont rapporté des taux d'accumulation plus élevés (33). La question à savoir si de tels niveaux de pénétration pourraient permettre d'obtenir une dose efficace de principe actif reste ouverte.

5.6.3 L'inflammation

Les résultats de l'article «1 » sur l'influence de la longueur de la chaîne de PEG sur la transcytose de NPs à travers une monocouche de cellules endothéliales, nous ont conduit à nous poser la question suivante, à savoir si l'amélioration de la transcytose en fonction de la longueur de la chaîne de PEG pouvait être reliée à l'induction de l'inflammation et en conséquence à une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire.

Dans l'article «2», la possibilité d'induction de l'inflammation en fonction de la longueur de la chaîne de PEG a été évaluée sur le même modèle que celui utilisé pour étudier l'endocytose et la transcytose. Le deuxième modèle de cellules endothéliales, les HUVECs, a été choisi pour confirmer les résultats obtenus sur bEnd.3. Plusieurs paramètres justifient le choix des HUVECs:

- bEnd.3 est une lignée endothéliale immortalisée, il est donc possible qu'elle ait subi une modification dans l'expression génétique. Cependant, la confirmation des résultats obtenus avec bEnd.3 sur un modèle cellulaire primaire pourrait être pertinente.
- bEnd.3 est une lignée murine tandis que HUVEC est d'origine humaine.
- Parmi les cellules vasculaires primaires d'origine humaine, les HUVEC sont plus facilement accessibles

- Les HUVECs ont été beaucoup utilisées pour les études d'inflammation (34, 35).

L'influence de la longueur de la chaîne de PEG à la surface des NPs a été observée dans deux modèles cellulaires, ce qui confirme le comportement général des NPS PLA-PEG_x sur l'induction de l'inflammation vis-à-vis des cellules endothéliales vasculaires.

L'expression génique d'une vaste gamme de cytokines, de chimiokines et de molécules d'adhésion reliées à l'inflammation a été étudiée dans l'article «2». À ce jour il n'existe pas d'études qui ont étudié de façon si complète l'effet inflammatoire des NPs polymériques.

5.6.4 Endocytose et induction de la réponse inflammatoire

Les mécanismes possibles d'induction de l'inflammation par les NPs polymériques ne sont pas bien connus. Le rôle de l'endocytose sur l'induction de l'inflammation a été clarifié par Krüger *et al.* Il a été démontré que l'inhibition de certaines voies d'endocytose diminuait la réponse inflammatoire des cellules Caco-2 lors de leur exposition aux NPs de TiO₂ (36). Dans l'article «1», l'étude de l'endocytose a été effectuée dans un intervalle de 3h et montre que le taux d'endocytose des NPs PLA-PEG_x augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne de PEG. Ces résultats nous amènent à penser que l'augmentation du taux d'endocytose pourrait conduire à une augmentation de l'induction de la réponse inflammatoire. Cependant, aucune différence significative entre les différentes longueurs de chaîne de PEG n'a été observée.

De plus, une étude effectuée sur des NPs TiO₂ a démontré que ce type de NPs peut induire l'inflammation via différents récepteurs de type « Toll ». Les mécanismes d'action et la localisation de ces récepteurs au niveau des cellules sont différents. À titre d'exemple TLR4, qui est principalement localisé à la membrane plasmique, peut initier une réponse inflammatoire plus rapide et la réponse inflammatoire est induite par le contact des NPs avec la surface cellulaire. D'autres récepteurs Toll tels que TLR3 et TLR7 nécessitent l'internalisation des NPs pour avoir un rôle dans cette induction (37). Les NPs de carbone peuvent également induire une réponse inflammatoire par interaction directe de NP avec des récepteurs de type Toll. Dans cette étude les sites d'interactions avec les NPs ont été

modélisés et cela démontre que les propriétés de surface des NPs pourraient influencer l'induction de la réponse inflammatoire (38).

5.6.5 Dégradation des NPs et induction de l'inflammation

La dégradation lysosomale des NPs possédant des polymères avec les groupes polyéthers peut également libérer des ROS intracellulaires (39). La génération de ROS pourrait déclencher la cascade de l'inflammation. Un ensemble de mécanismes d'induction de la réponse inflammatoire pourrait être imaginé pour les NPs PLA-PEG_x. Cependant, étant donné que le niveau de production des ROS induit par les NPs PLA-PEG_x n'est pas détectable (Article 2), il est probable que ce mécanisme ne joue pas un rôle majeur dans l'induction de l'inflammation dans l'intervalle de temps étudié.

On a étudié l'effet de la longueur de PEG sur la transcription des principaux gènes impliqués dans l'inflammation. La régulation post-transcriptionnelle de ces gènes pourrait également moduler les quantités de protéines correspondantes et donc influencer sur l'état d'activation inflammatoire des cellules en culture étudiées. L'information recueillie avec la qPCR ne donne qu'un portrait partiel de la cascade inflammatoire et donc de futurs tests de qualification de type ELISA seront nécessaires pour répondre à cette question.

5.7 Perspectives : futures études pour la suite du projet

5.7.1 Endocytose et transcytose au niveau de la BHE

Plusieurs perspectives à court terme sont imaginables pour la suite du projet initié dans le cadre de l'article «1». Tel qu'il a été mentionné dans l'introduction (section 1.6.1), les propriétés de surface des NPs, y compris la longueur de la chaîne de PEG peuvent influencer la composition de la couronne protéique. Les études complémentaires en présence du sérum et aussi la préincubation des NPs avec du sérum pourraient nous donner des informations intéressantes sur l'influence de la couronne protéique en fonction de la longueur de la chaîne de PEG sur l'endocytose et la transcytose.

Nous avons choisi la stratégie d'étudier les interactions des NPs PEGylées sans ligand de ciblage avec les cellules endothéliales vasculaires. Certaines études démontrent que les NPs PLGA sans ligand de ciblage peuvent traverser la BHE et peuvent être accumulées dans différentes parties de cerveau (40). Cependant plusieurs chercheurs

présentent des points de vue différents à ce sujet. Plusieurs études ont montré que le taux de passage de la BHE par des NPs sans ligand de ciblage est très faible (41, 42). Nous avons fait l'hypothèse que l'optimisation des propriétés de surface des NPs en utilisant une longueur optimale de la chaîne de PEG, pourrait améliorer le passage de la BHE. Il est possible également de spéculer qu'en ajoutant des ligands de ciblage sur les NPs avec la longueur optimale de la chaîne de PEG le passage de la BHE pourrait être amélioré encore plus efficacement. L'optimisation étape par étape des NPs pourrait nous permettre de designer des systèmes plus efficaces et diminuer le risque d'échec. Sans expériences spécifiques, il est toutefois difficile de prévoir l'effet de la longueur de la chaîne de PEG sur l'efficacité du ciblage ou passage des NPs à travers d'un modèle de BHE. Ce sujet aurait besoin des développements et les études supplémentaires qui pourraient être le sujet de travaux futurs.

Plusieurs perspectives sont également envisageables à plus long terme pour la suite de l'article «1 ». Les résultats présentés ont été obtenus sur un modèle *in vitro*. La confirmation de ces résultats sur un modèle *in vivo* est nécessaire. La biodistribution des NPs et le suivi de leur accumulation dans le cerveau pourraient être réalisés dans un modèle de petits animaux tel que le poisson-zèbre. Le modèle de poisson-zèbre présente plusieurs avantages: 1) une reproduction rapide, le taux de reproduction élevé donne la possibilité d'effectuer les tests avec un nombre élevé d'échantillons pour chaque essai; 2) Le coût lié aux expériences est relativement faible; 3) Les poissons-zèbre sont transparents, ce qui permet de suivre les NPs par les techniques d'imagerie; 4) Il existe de nombreuses variantes génétiques. Des études préliminaires de toxicité des NPs sur ce modèle animal ont été réalisées dans le laboratoire du Pr K Patten (INRS, Laval). Les résultats montrent une absence de toxicité des NPs sur le développement des larves (données non incluses dans cette thèse). Ce modèle est donc prometteur pour la suite de ces essais.

5.7.2 NPs et inflammation au niveau de la BHE

Dans l'article «2», l'étude de l'expression génique montre que les NPs PLA-PEGx peuvent induire une réponse inflammatoire transitoire. Il serait donc intéressant de vérifier si l'étude de l'expression protéique peut confirmer ces résultats. En effet l'induction de

l'inflammation met en jeu des régulations tant au niveau de l'expression des gènes que de la traduction des ARNm (43).

Le potentiel de l'induction de l'inflammation par les NPs PLA-PEGx a été évalué sur un modèle de cellules endothéliales vasculaires. *In vivo*, les événements inflammatoires en réponse aux NPs résultent d'une interaction complexe entre différentes lignées cellulaires. En effet, les cellules endothéliales ne sont qu'un élément de ce puzzle complexe mettant en relation cellules du système immunitaire et endothéliales. De plus, le processus d'inflammation est un phénomène en cascade avec la sécrétion de messagers (cytokines et chimiokines).

Tel qu'il a été montré dans la Table S6 de l'article «2», la plupart des cytokines et chimiokines et les molécules adhésions réagissent sur les cellules du système immunitaire telles que les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes. Les cellules du système immunitaire activées par les NPs ou par des cytokines et chimiokines secrètent à leur tour aussi des cytokines et chimiokines et les molécules adhésions. Ces molécules peuvent aussi affecter les cellules vasculaires endothéliales (44-46). L'effet potentiellement inflammatoire des NPs pourrait donc être étudié sur des systèmes *in vitro* en coculture (ou multicellulaires) incluant cellules immunitaires et endothéliales. Il pourrait également être étudié en utilisant des milieux conditionnés de cellules immunitaires exposées aux NPs, ce qui pourrait nous donner les informations plus proches de la situation *in vivo*. Également, l'influence de l'inflammation sur l'endocytose et la transcytose des NPs en fonction de la longueur de la chaîne de PEG pourrait être évaluée sur un modèle de BHE dans un contexte inflammatoire, mimant la BHE dans un contexte pathologique. L'effet de synergie de l'inflammation induit par les NPs sur un modèle de cellules endothéliales inflammatoires pourrait être exploré.

Dans ces travaux, nous nous sommes intéressés à étudier le comportement des NPs PLA-PEG vides, sans principe actif encapsulé, vis-à-vis des cellules endothéliales. Quelques études ont démontré que la présence et la nature de principe actif pourrait modifier les profils pharmacocinétiques et thérapeutiques des NPs *in vivo*. A titre d'exemple, des études ont rapporté le phénomène de clairance sanguine accélérée des liposomes PEGylés à la suite de multiples injections (47). Cependant, les liposomes

PEGylés chargée en doxorubicine ou en mitoxantrone ne provoquent pas ce phénomène de clairance sanguine accélérée (48). Ces résultats permettent de penser que l'encapsulation de certains médicaments cytotoxiques dans le cœur d'un nanovecteur pourrait modifier le profil d'immunogénicité des nanovecteurs. On peut faire l'hypothèse que la présence d'autres types de principes actifs encapsulés pourrait aussi modifier la réponse des systèmes biologiques aux nanovecteurs, que ce soit au niveau de l'endocytose, la transcytose ou la réponse inflammatoire. Les résultats obtenus en étudiant le devenir biologique des NPs vides pourraient ne représenter qu'une réponse partielle à l'étude du devenir biologique des NPs à visée thérapeutique.

5.8 Conclusion générale

Nous avons posé comme hypothèse de recherche que la couronne de PEG en surface des NPs peut jouer un rôle sur les interactions avec la BHE, notamment au niveau du passage et de l'induction de la réponse inflammatoire.

Tel qu'énoncé dans notre hypothèse, nos résultats indiquent que la longueur de la chaîne influence bien l'endocytose et la transcytose des NPs. Le taux plus élevé d'endocytose et de transcytose est obtenu pour PEG5kDa et PEG10kDa. Les voies des clathrines et la macropinocytose sont les deux voies d'endocytose majoritaire qui participent à l'endocytose des NPs PLA-PEGx. La voie de la macropinocytose semble jouer un rôle important dans la transcytose des NPs. D'un autre côté, l'effet de la longueur de la chaîne de PEG sur l'induction de l'inflammation n'est pas très déterminant dans notre modèle. Les NPs PEGylées entraînent une augmentation transitoire de l'expression génique de certaines cytokines et chimiokines. Cependant, aucune différence significative entre les différentes longueurs de chaîne de PEG n'a été observée, alors qu'une différence significative entre le revêtement de chaînes de PEG attaché ou adsorbé physiquement a été remarquée.

Tel que discuté de façon plus détaillée dans les sections précédentes, en perspective, ce travail mériterait d'être complété par des expériences *in vivo* pour le passage de la BHE pour valider les tendances observées. Également les effets potentiellement inflammatoires devraient être étudiés au niveau de la production de protéines proinflammatoires. Également, l'implication des cellules immunitaires en contact avec les NPs, sur l'état

inflammatoire des cellules endothéliales vasculaires et sur la perméabilité de la BHE devrait être investiguée.

Dans un domaine (les nanotechnologies) dans lequel les études systématiques des paramètres physicochimiques sont l'exception plus que la règle, cette étude constitue la première exploration systématique du rôle de la longueur de la chaîne de PEG sur les interactions des NPs avec un modèle *in vitro* de BHE. L'exploration effectuée dans le cadre de cette thèse permet de contribuer à identifier la meilleure option pour promouvoir l'endocytose et la transcytose des NPs polymères à travers la BHE, tout en considérant le profil inflammatoire et toxique du choix final de la longueur de la chaîne de PEG.

Références

1. Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*. 2007;28(5):869-76.
2. Gu F, Langer R, Farokhzad OC. Formulation/preparation of functionalized nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2009;544:589-98.
3. Marrache S, Dhar S. Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(40):16288-93.
4. Rabanel J-M, Faivre J, Tehrani SF, Lalloz A, Hildgen P, Banquy X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7(19):10374-85.
5. Lalloz A, Bolzinger M-A, Briançon S, Faivre J, Rabanel J-M, Garcia Ac A, et al. Subtle and unexpected role of PEG in tuning the penetration mechanisms of PLA-based nanoformulations into intact and impaired skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;563:79-90.
6. Lince F, Marchisio DL, Barresi AA. Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of colloid and interface science*. 2008;322(2):505-15.
7. F.Tehrani S, Bernard-Patrzynski F, Puscas I, Leclair G, Hildgen P, Roullin VG. Length of surface PEG modulates nanocarrier transcytosis across brain vascular endothelial cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2019;16:185-94.
8. Rabanel J-M, Hildgen P, Banquy X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *Journal of Controlled Release*. 2014;185:71-87.
9. Canzi G, Mrse AA, Kubiak CP. Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy as a Reliable Alternative to TEM for Determining the Size of Gold Nanoparticles in Organic Solutions. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2011;115(16):7972-8.
10. Bakkour Y, Darcos V, Li S, Coudane J. Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) as a powerful tool for amphiphilic block copolymer characterization and for critical micelle concentration (CMC) determination. *Polymer Chemistry*. 2012;3(8):2006-10.
11. Lucas LH, Larive CK. Measuring ligand-protein binding using NMR diffusion experiments. *Concepts in Magnetic Resonance Part A: An Educational Journal*. 2004;20(1):24-41.
12. Rode García T, García Ac A, Lalloz A, Lacasse F-X, Hildgen P, Rabanel J-M, et al. Unified Scaling of the Structure and Loading of Nanoparticles Formed by Diffusion-Limited Coalescence. *Langmuir*. 2018;34(20):5772-80.
13. Hrkach JS, Peracchia MT, Bomb A, Lotan n, Langer R. Nanotechnology for biomaterials engineering: structural characterization of amphiphilic polymeric nanoparticles by ^1H NMR spectroscopy. *Biomaterials*. 1997;18(1):27-30.
14. Moore TL, Rodriguez-Lorenzo L, Hirsch V, Balog S, Urban D, Jud C, et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(17):6287-305.

15. Nance EA, Woodworth GF, Sailor KA, Shih T-Y, Xu Q, Swaminathan G, et al. A dense poly(ethylene glycol) coating improves penetration of large polymeric nanoparticles within brain tissue. *Science translational medicine*. 2012;4(149):149ra19-ra19.
16. Rojnik M, Kocbek P, Moret F, Compagnin C, Celotti L, Bovis MJ, et al. In vitro and in vivo characterization of temoporfin-loaded PEGylated PLGA nanoparticles for use in photodynamic therapy. *Nanomedicine*. 2012;7(5):663-77.
17. Watanabe T, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, et al. Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2013;36(3):492-5.
18. Gosselet F. Modélisation in vitro de la barrière hémato-encéphalique. *Med Sci (Paris)*. 2017;33(4):423-31.
19. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud P-O, Deli MA, et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016;36(5):862-90.
20. Li G, Simon MJ, Cancel LM, Shi ZD, Ji X, Tarbell JM, et al. Permeability of endothelial and astrocyte cocultures: in vitro blood-brain barrier models for drug delivery studies. *Annals of biomedical engineering*. 2010;38(8):2499-511.
21. Neng L, Zhang F, Kachelmeier A, Shi X. Endothelial cell, pericyte, and perivascular resident macrophage-type melanocyte interactions regulate cochlear intrastrial fluid-blood barrier permeability. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 2013;14(2):175-85.
22. Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel Á, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry International*. 2009;54(3):253-63.
23. Donahue ND, Acar H, Wilhelm S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced drug delivery reviews*. 2019;143:68-96.
24. Brown RC, Morris AP, O'Neil RG. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res*. 2007;1130(1):17-30.
25. Guarnieri D, Guaccio A, Fusco S, Netti PA. Effect of serum proteins on polystyrene nanoparticle uptake and intracellular trafficking in endothelial cells. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011;13(9):4295.
26. Ivanov AI. Pharmacological Inhibitors of Exocytosis and Endocytosis: Novel Bullets for Old Targets. In: Ivanov AI, editor. *Exocytosis and Endocytosis*. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 3-18.
27. Georgieva JV, Kalicharan D, Couraud P-O, Romero IA, Weksler B, Hoekstra D, et al. Surface characteristics of nanoparticles determine their intracellular fate in and processing by human blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2011;19(2):318-25.
28. Liu NQ, Lossinsky AS, Popik W, Li X, Gujuluva C, Kriederman B, et al. Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis

dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Journal of virology*. 2002;76(13):6689-700.

29. Kafa H, Wang JT-W, Rubio N, Venner K, Anderson G, Pach E, et al. The interaction of carbon nanotubes with an in vitro blood-brain barrier model and mouse brain in vivo. *Biomaterials*. 2015;53:437-52.

30. Calvo P, Gouritin B, Chacun H, Desmaële D, D'Angelo J, Noel J-P, et al. Long-Circulating PEGylated Polycyanoacrylate Nanoparticles as New Drug Carrier for Brain Delivery. *Pharmaceutical Research*. 2001;18(8):1157-66.

31. Park K. Optimal nanoparticle design for effective transport through the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release*. 2019;295:290.

32. Johnsen KB, Bak M, Melander F, Thomsen MS, Burkhart A, Kempen PJ, et al. Modulating the antibody density changes the uptake and transport at the blood-brain barrier of both transferrin receptor-targeted gold nanoparticles and liposomal cargo. *Journal of Controlled Release*. 2019;295:237-49.

33. Lam FC, Morton SW, Wyckoff J, Vu Han T-L, Hwang MK, Maffa A, et al. Enhanced efficacy of combined temozolomide and bromodomain inhibitor therapy for gliomas using targeted nanoparticles. *Nature Communications*. 2018;9(1):1991.

34. Mako V, Czucz J, Weiszhar Z, Herczenik E, Matko J, Prohaszka Z, et al. Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2010;77(10):962-70.

35. Cao Y, Gong Y, Liu L, Zhou Y, Fang X, Zhang C, et al. The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. *Journal of Applied Toxicology*. 2017;37(12):1359-69.

36. Wischke C, Krüger A, Roch T, Pierce BF, Li W, Jung F, et al. Endothelial cell response to (co) polymer nanoparticles depending on the inflammatory environment and comonomer ratio. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;84(2):288-96.

37. Chen P, Kanehira K, Taniguchi A. Role of toll-like receptors 3, 4 and 7 in cellular uptake and response to titanium dioxide nanoparticles. *Science and technology of advanced materials*. 2013;14(1):015008-.

38. Turabekova M, Rasulev B, Theodore M, Jackman J, Leszczynska D, Leszczynski J. Immunotoxicity of nanoparticles: a computational study suggests that CNTs and C60 fullerenes might be recognized as pathogens by Toll-like receptors. *Nanoscale*. 2014;6(7):3488-95.

39. Lyu S, Untereker D. Degradability of polymers for implantable biomedical devices. *International journal of molecular sciences*. 2009;10(9):4033-65.

40. Pahuja R, Seth K, Shukla A, Shukla RK, Bhatnagar P, Chauhan LKS, et al. Trans-Blood Brain Barrier Delivery of Dopamine-Loaded Nanoparticles Reverses Functional Deficits in Parkinsonian Rats. *ACS Nano*. 2015;9(5):4850-71.

41. Dong X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics*. 2018;8(6):1481-93.

42. Saraiva C, Praca C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2016;235:34-47.

43. Stumpo DJ, Lai WS, Blackshear PJ. Inflammation: cytokines and RNA-based regulation. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2010;1(1):60-80.

44. Liu X, Xue Y, Ding T, Sun J. Enhancement of proinflammatory and procoagulant responses to silica particles by monocyte-endothelial cell interactions. *Particle and fibre toxicology*. 2012;9:36.
45. Scheld WM, Whitley RJ, Marra CM. *Infections of the Central Nervous System*: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
46. Raines EW, Ferri N. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *J Lipid Res*. 2005;46(6):1081-92.
47. Ma Y, Yang Q, Wang L, Zhou X, Zhao Y, Deng Y. Repeated injections of PEGylated liposomal topotecan induces accelerated blood clearance phenomenon in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;45(5):539-45.
48. Laverman P, Carstens MG, Boerman OC, Dams ET, Oyen WJ, van Rooijen N, et al. Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;298(2):607-12.

Annexe 3: Curriculum vitae scientifique

Articles

(6) *PEG length of PLA-PEG nanoparticles modulates nanoparticle interactions with endothelial cells: effects on inflammatory responses and ROS production.* **Soudeh F. Tehrani**, Samuel Legeay, Jean-Michel Rabanel, Jérôme Cayon, Jérémie Riou, Patrick Saulnier, Sylvie Marleau¹, V. Gaëlle Roullin, Patrice Hildgen, Guillaume Bastiat. *Soumis à «Molecular Pharmaceutics » le 28 Août 2019.*

(5) Nanocarriers for the Pulmonary Delivery of Levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*: A Comparative Study. Rabeb Mouna Derbali ,Valery Aoun,Ghina Moussa Giorgia Frei , **Soudeh F. Tehrani**, Juliana Campos Del’Orto, Patrice Hildgen, V. Gaëlle Roullin*, Jeanne Leblond Chain*. *Mol Pharm.* 2019.16(5): p1906-1916.

(4) PEG length triggers polymeric nanoparticle transcytosis across brain endothelial cells **S. F. Tehrani**, F. Bernard, I. Puscas, G. Leclair, P. Hildgen and V G. Roullin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2019.16 p 185-194.

(3) Nanoparticle heterogeneity: an emerging structural parameter influencing particle fate in biological media? J-M Rabanel*, V Adibnia*, **S. F. Tehrani***, S. Sanche, P. Hildgen, X. Banquy, et al. *Nanoscale*. 2019.11(2): p383-406. **Ces auteurs ont participé à ce travail à part égale*

(2) Release Kinetics from Nano-Inclusion-Based and Affinity-Based Hydrogels: A Comparative Study. S. Alsharif, P-L. Latreille, O. Gourgas, **S. F. Tehrani**, V.G. Roullin, X. Banquy, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2017 ;529 :739-49.

(1) Effect of polymer architecture on the structural and biophysical properties of PEG-PLA nanoparticles. J-M. Rabanel, J. Faivre, **S. F. Tehrani**, A. Lalloz, P. Hildgen, X. Banquy. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015. 7(19) p10374–10385 .

Affiches (Internationales)

(6) PEG length of PLA-PEG nanoparticles modulates nanoparticle interactions with brain endothelial cells”. **S. F. Tehrani** et al. Société Française de Nanomédecine, décembre 2017, Bordeaux , France

(5) Development of a multi-layer model of the Blood-Brain Barrier, based on primary murine cells for the rapid screening of drug candidates and innovative formulations I. Pucas, F Bernard, **S.F Tehrani**, G Leclair, V.G Roullin, European Society for Biomaterials Annual meeting, Athene, Grèce, Septembre 2017

(4) Effect of surface properties of PLGA-PEG nanovectors on BBB translocation”

S.F. Tehrani, et al. CRS Annual Congress,, Juillet 2016, Seattle, USA

(3) PEG-PLGA nanoparticles: investigation of BBB translocation according to PEG chain length using a primary endothelial cell permeability model. **S.F. Tehrani** et al. WBC, Mai

2016, Montréal, Canada, Abstract publié dans Front. Bioeng. Biotechnol. Conference, DOI: 10.3389/conf.FBIOE.2016.01.02757

(2) Comprehensive Study on the Freeze-Drying Process to Increase the Long-Term Stability of Polymeric, Drug-Loaded Nanoparticles” H. M. Besheir, **S. F. Tehrani**, V. G. Roullin.

CSPS, 10-13 juin 2014, Montréal, Qc.

(1) In vitro Comparison of the Efficiency of Levofloxacin-Loaded Polymeric Nanoparticles Versus Liposomes to Kill Pseudomonas Aeruginosa Developing in Cystic Fibrosis Patients.

J. Campos Del’Orto, K. Plourde, **S.F. Tehrani**, V. G. Roullin, P. Hildgen, J. Leblond Chain. CSPS, 10-13 juin 2014, Montréal, Qc.

Présentation orale

- “Stimulation of transcytosis of PLA-PEG nanoparticle across brain endothelial cells by remodelling surface PEG brush properties” S.F Tehrani, et al. EBS, Athènes Grèce, Septembre 2017

- “ Effect of surface properties of PLA-PEG nanovectors on BBB translocation”, Axe de formulation et analyse de médicaments, Laurentides, Québec, 15 octobre 2016

- “Smart polymeric nanoparticles for the diagnosis of glioma”, Oncopôle, Toulouse, France, 7 juillet 2016

Bourses

- Bourse de fin d'études doctorales de la Faculté des études supérieures et postdoctorales, Université de Montréal, 2018 (12 mois, 12 000\$).

- Bourse de programme d'aide au rayonnement du savoir étudiant des cycles supérieurs, Faecum Université de Montréal, 2018 (1000\$)

- Bourses pour de courts séjours d'études universitaires à l'extérieur du Québec, Ministère de l'Éducation et de l'Enseignement supérieur du Québec, Québec Canada (9000 \$)

- Bourse de mobilité internationale, Faculté de pharmacie, Université de Montréal (2000 \$)

- Bourses de recherche Mitacs Globalink, Gouvernement du Canada (7000 \$)

- 8^{ème} Concours de bourses de voyage et formation, Groupe de recherche universitaire sur le médicament (GRUM, Montréal) 2016.

Prix et distinctions

- Prix de la meilleure présentation par affiche, Société Française de Nanomédecine, décembre 2017, Bordeaux, France (Prix de 500 Euros)
- Prix de la meilleure présentation par affiche, Rendez-vous de la recherche pharmaceutique (5^e édition), Montréal, décembre 2016. (Prix de 250\$)
- Prix de la meilleure présentation orale de l'AFAM de la Faculté de pharmacie, Université de Montréal, octobre 2016 (Prix de 1500\$)

Implications sociales

- Membre de comité organisationnel du Congrès International de FIP 2020 à Montréal (« Young Sessions »)
- Membre de comité organisationnel de la journée de la recherche conjointe entre les Facultés de pharmacie de l'Université Montréal et de l'Université de Toronto
- Représentante étudiante au Comité International de la Faculté de pharmacie (2016-2017)
- Membre du Conseil des étudiants aux cycles supérieurs de la Faculté de pharmacie Université de Montréal (2015-2017)
- Membre étudiant conseil d'administration du chapitre canadien de la «Controlled Release Society (CRS)» (2015-Présent)
- Représentante étudiante au Comité des bibliothèques de l'Université de Montréal (2015-2016)

